

LETHAL CONCENTRATION 50% OF PATHCHOULI OIL (POGOSTEMON CABLIN) TOWARDS ZEBRAFISH EMBRYO (DANIO RERIO)

Romel Ciptoadi Wijaya*

*Islamic University of Malang

Email: romelciptoadi@gmail.com

Abstract

Patchouli Oil requires toxicity testing for safety before we can use it widely. It causes side effects such as nausea, vomiting and loss of appetite in some people. Determination of lethal concentration 50% (LC50) in the early stages of zebrafish embryos development will provide an easier, faster and precise prediction of toxicity. At a certain dose, it can cause impairment and death toward organisms. Therefore, the aim of this study was to determine LC50 of Patchouli Oil in carboximethyl cellulose emulsifier towards zebrafish embryo (Danio rerio). Laboratory experimental study was using zebrafish embryos at 2 hours post fertilization. The total of 160 embryos were used and divided into 8 groups, i.e.; Negative control (KN) was given the embryonic fluid, positive control 1 was given 5000 ppm of patchouli oil (KP1), positive control was given 5000 ppm of CMC (KP2), and 5 treatment groups, i.e.; concentration of 10 ppm (P1), 30 ppm (P2), 60 ppm (P3), 90 ppm (P4) and 120 ppm (P5) of Patchouli oil which was emulsified in CMC. The study was conducted with 3 times repetition. Data collection was done by calculating total of embryo's deaths for each treatment at 24-72 hours of exposure. Data were analyzed using Regression Probit Analysis. Mortality in the group of KN was 1.6%, KP1 was 98.3% and KP2 was 0%. Meanwhile in the treatment group of P1, P2, P3, P4 and P5 respectively were 0%, 5%, 10%, 25%, and 50%. Based on these results, Lethal Concentration 50% of Patchouli Oil in CMC emulsifier towards zebrafish embryo is 120 ppm.

Key word: Patchouli Oil, Pogostemon cablin, Lethal concentration 50%, toxicity, Danio rerio, embryo

I. PENDAHULUAN

Penggunaan minyak atsiri nilam (MAN) memerlukan uji toksisitas untuk keamanan penggunaannya. Pemakaian minyak atsiri nilam sebagai anti-mikroba, imunomodulator, dan anti-oksidan memiliki efek samping yang berhubungan dengan aroma, bahan aktif, dan pengemulsinya.^{1,2,3,4} Aroma MAN dapat menyebabkan mual dan hilangnya nafsu makan pada sebagian orang.⁵ Dosis MAN 4.693 mg/KgBB dengan pengemulsi *olive oil* merupakan nilai *lethal dose 50%* (LD50) MAN pada tikus wistar dengan gejala penurunan aktivitas lokomotor, menimbulkan gangguan pernapasan (*gaspings*) dan kematian.⁶ Nilai *Lethal concentration 50%* (LC50) MAN dengan pelarut aseton pada larva *C. Rosaceana* adalah 2,8 µL/mL. Salah satu uji keamanan dapat dilakukan dengan menghitung nilai LC50.⁷

Lethal concentration 50% (LC50) adalah indikator toksisitas yang efektif pada embrio ikan zebra (*Danio rerio*).⁸ Parameter LC50 lebih cepat dan mudah diamati hasilnya pada embrio, larva dan ikan dewasa.⁹ Subjek embrio (*early-life stage*) memberikan prediksi toksisitas jangka panjang yang lebih tepat pada 80% bahan uji.¹⁰ Embrio ikan zebra memiliki kelebihan, antara lain lebih murah dan lebih mudah karena didapatkan melalui proses *breeding* ikan zebra dewasa dan memiliki sensitifitas yang lebih baik karena spesies tersebut

mempunyai 70-85% kemiripan DNA dengan manusia. Embrio ikan zebra yang transparan memudahkan peneliti mengamati morfologi, perilaku embrio di dalam korion dan denyut jantung.¹¹

Berdasarkan data di atas, peneliti ingin mengetahui LC50 MAN terhadap embrio ikan zebra.

II. METODE PENELITIAN

Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratorium menggunakan desain penelitian eksplorasi bertujuan untuk mengetahui *lethal concentration 50* (LC₅₀) MAN embrio ikan zebra. Pajanan dilakukan selama 24 jam dengan lama pengamatan 96 jam untuk menghitung jumlah kematian hewan coba secara kumulatif.

Ethical Clearance

Penelitian ini telah disetujui pada bulan Juli 2014 dan mendapat surat laik etik dari Komisi Etik Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya No. 398/EC/KEPK-S1-PD/07/2014.

Tempat dan Waktu Penelitian

Simplicia tanaman nilam dibeli dari Pusat Penyulingan Rakyat, Kesamben, Blitar. Penyulingan dilaksanakan di Akademi Farmasi Putra Bangsa, Malang. Adaptasi dan perlakuan hewan coba dilakukan di Laboratorium Ikan

Zebra, Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang, pada bulan Maret-Juli 2014.

Populasi dan Sampel Penelitian

Jumlah sampel embrio ikan zebra yang dibutuhkan dalam satu konsentrasi adalah 20 embrio. Sehingga dalam satu *well* dengan konsentrasi yang sama bisa diisi 1 embrio, dengan total embrio yang digunakan adalah 240 embrio ikan zebra 2 jam pos fertilisasi. Embrio disortir sebelum digunakan agar memperoleh embrio yang sehat dan meminimalisir bias penelitian.

Proses Penyulingan Nilam

Proses penyulingan menggunakan Destilasi Uap. Alat destilasi uap terdiri atas ketel uap, *distillation still*, *condensor* dan penampung minyak dan air. Simplisia atau bagian tanaman yang akan disuling harus diisi secara penuh di dalam *distillation still*. Hal ini bertujuan agar tidak ada celah kosong di dalam *distillation still* yang dapat mengakibatkan menurunnya kuantitas dan kualitas minyak atsiri. Jumlah air yang dipanaskan dalam ketel uap harus diawasi secara rutin. Durasi penyulingan dapat bervariasi antara 6 - 8 jam. Proses penyulingan tersebut menghasilkan 2 produk berbeda, yaitu; bahan larut air, yang terlarut dalam uap air yang terkondensi, yang dikenal dengan nama hydrosol, dan bahan tidak larut air yang disebut sebagai minyak atsiri.^{9,10}

Pembuatan Emulsi

Pembuatan emulsi MAN menggunakan metode *bottle (forbes)*. Setengah dari massa MAN yang akan diemulsi dicampurkan bersama MAN ke dalam botol. Campuran MAN dan pengemulsi kemudian dibiarkan selama 15 menit, kemudian ditambahkan cairan embrionik (50°C) perlahan-lahan hingga mencapai 50 ml. Selama proses penambahan cairan embrionik (CE), botol yang telah berisi emulsi dihomogenisasi menggunakan *Vortex* dengan skala kecepatan 7.¹²

Prosedur Pemijahan Ikan Zebra

Proses *breeding* ikan zebra mengacu pada metode yang telah dijelaskan oleh Nagel (2002). Ikan zebra diberi pakan hidup *Artemia*, sebanyak ± 500 ml, yaitu 2 kali sehari. Kondisi air pada akuarium dipertahankan bersih, untuk menjamin pH 7-8 dan kesehatan ikan. Rasio jantan dan betina dalam satu akuarium adalah 2:1, sehingga dalam satu akuarium terdapat 20 ekor ikan jantan dan 10 ekor ikan betina. Suhu akuarium dipertahankan 25-28°C.⁹

Siklus 10 jam gelap dan 14 jam terang dipertahankan agar ikan dapat beristirahat dan beraktifitas dengan normal. Sehari sebelum *breeding*, dilakukan penggantian air akuarium setelah diberi pakan pada sore hari. Kemudian dipasang *egg trap* sebagai tempat menampung dan melindungi telur dari kanibalisme ikan zebra. Pada saat proses berlangsung *breeding*, laboratorium ikan zebra dipertahankan dalam kondisi

tenang untuk meminimalisir stres. Telur dapat dipanen pada pukul 9.30 dan segera melalui proses pencucian. Pencucian adalah dengan memindahkan telur sebanyak 3-4 kali pada wadah berisi cairan embrionik bersih. Setelah tampak bersih, telur disortir dibawah mikroskop untuk menjamin kualitas telur agar dapat digunakan dalam penelitian dan meminimalisir bias penelitian.⁹

Prosedur Uji Toksisitas Akut

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap :

Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan dilakukan untuk menentukan konsentrasi yang tepat untuk digunakan pada penelitian utama. Penelitian pendahuluan mengacu pada *lethal dose 50%* (LD50) MAN terhadap tikus wistar, yaitu 4693 mg/KgBB. Konsentrasi yang digunakan adalah 4693 mg/L, 2346,5 mg/L dan 1173,25 mg/L. Ketiga konsentrasi tersebut kemudian diencerkan sebanyak 10 \times , 100 \times , 1000 \times , 10.000 \times dan 100.000 \times . Kemudian seluruh konsentrasi tersebut dikonversikan dalam *part per million* (ppm), sehingga didapatkan konsentrasi tertinggi yang dapat membunuh seluruh hewan coba adalah 100 ppm dan konsentrasi yang tidak menyebabkan kematian pada seluruh hewan coba adalah 10 ppm.

Penelitian Utama

Penelitian utama dilakukan untuk mengetahui konsentrasi dimana hewan uji mati 50% dengan lama pajanan 24 jam, serta lama pengamatan 96 jam. Konsentrasi yang digunakan pada penelitian utama adalah berdasarkan pada penelitian pendahuluan, yaitu; 10 ppm, 30 ppm, 60 ppm, 90 ppm, dan 120 ppm.

Penelitian utama dilakukan menggunakan kontrol negatif (CE), kontrol positif 1 (CE dan MAN 0,5%), kontrol positif 2 (CE dan CMC 0,5%) dan 5 konsentrasi emulsi MAN 10 ppm, 30 ppm, 60 ppm, 90 ppm, dan 120 ppm.

Data mortalitas embrio ikan pada penelitian utama diuji untuk mendapatkan nilai LC₅₀ digunakan perhitungan analisa regresi probit.¹³ Parameter kematian embrio adalah koagulasi, keruh, serta tidak adanya denyut jantung pada embrio ikan zebra.⁹

Pengumpulan dan Analisa Data

Data diolah dengan menggunakan metode Analisis Regresi Probit untuk menghitung LC₅₀. Perhitungan statistik dilakukan dengan menggunakan program statistik SPSS 16.00. Penggunaan analisis regresi probit merupakan model analisis regresi yang paling banyak digunakan untuk menentukan perkiraan dosis atau konsentrasi yang dapat membunuh 50% hewan coba (LC50/LD50). Analisis regresi probit dipilih karena lebih tepat dalam memprediksi dosis/konsentrasi dalam

rentang kematian yang luas dan dapat memprediksi waktu kematian hewan coba apabila pajanan mencapai 96 jam.¹³

III. HASIL PENELITIAN

Karakteristik Populasi

Hewan coba yang digunakan adalah embrio ikan zebra pada 2 jam pos fertilisasi. Jumlah sampel yang digunakan adalah 240 embrio ikan zebra yang terbagi dalam 12 kelompok dengan 3 kali pengulangan. Masing-masing embrio diletakan pada setiap well. Pajanan emulsi MAN dilakukan selama 24 jam. Inkubator untuk menyimpan embrio diatur pada suhu 26±1°C.⁹ Ringkasan kakarakteristik populasi penelitian dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik populasi

Kelompok	Usia (hpf)	Total embrio	Pajanan (jam)	Konsentrasi MAN (ppm)
KN	2	20	24	0
KP1	2	20	24	5000
KP2	2	20	24	0
P1	2	20	24	10
P2	2	20	24	30
P3	2	20	24	60
P4	2	20	24	90
P5	2	20	24	120

Keterangan :

- KN =Kontrol Negatif (CE)
- KP1 =Kontrol Positif 1 (MAN 5000 ppm + CE)
- KP2 =Kontrol Positif 2 (CMC 5000 ppm + CE)
- P1 =Perlakuan 1 (MAN 10 ppm+ CMC + CE)
- P1 =Perlakuan 2 (MAN 30 ppm+ CMC + CE)
- P3 =Perlakuan 3 (MAN 60 ppm+ CMC + CE)
- P4 =Perlakuan 4 (MAN 90 ppm+ CMC + CE)
- P5 =Perlakuan 5 (MAN 120 ppm+ CMC + CE)

Toksitas Minyak Atsiri Nilam Pada Lethal Concentration 50%

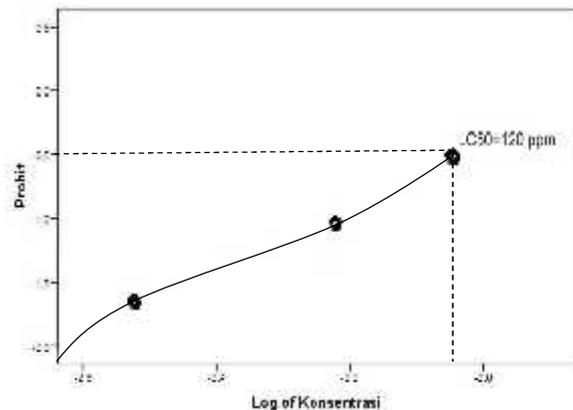
Tabel 2. Mortalitas Embrio dengan 3 kali pengulangan

no	Kelompok	kematian			Mortalitas (%)
		1	2	3	
1	KN	0	0	1	1,6%
2	KP1	20	20	19	98,3%
3	KP2	0	0	0	0%
4	P1	0	0	0	0%
5	P2	0	2	1	5%
6	P3	2	3	1	10%
7	P4	5	6	4	25%
8	P5	9	12	9	50%

Kematian pada hewan coba dapat dilihat pada Tabel 2, di mana terdapat 4 pola kematian berbeda, yaitu mendekati 100% kematian pada kontrol positif MAN

(KP1). Kedua kematian dengan mortalitas mendekati 0% pada kontrol negatif (KN), kontrol positif CMC (KP2) dan kelompok perlakuan MAN 10 ppm dengan pengemulsi CMC. Ketiga adalah pola kematian dengan presentasi kurang dari 50% yaitu pada kelompok perlakuan konsentrasi MAN 30 ppm (P2), 60 ppm (P3) dan 90 ppm (P4). Pola kematian berikutnya adalah kematian dengan mortalitas 50%, yaitu pajanan MAN 120 ppm dengan pengemulsi CMC.

Gambar 1. Transformasi Hasil Analisis Regresi Probit.



Berdasarkan hasil tersebut, kematian pada 50% hewan coba terjadi pada kelompok P5 menunjukkan bawa LC50 MAN pada embrio ikan zebra adalah sebesar 120 ppm. Hal ini konsisten terhadap hasil analisa regresi probit yang menunjukkan nilai LC50 MAN pada Gambar 1.

IV. PEMBAHASAN

Karakteristik Populasi

Hewan coba yang digunakan adalah embrio pada 2 jam pos fertilisasi. Pemilihan ini berdasarkan pengamatan embrio yang hidup dan layak untuk digunakan hanya dapat ditentukan pada 2 jam pos fertilisasi, yaitu ketika pertumbuhan embrio mencapai fase blastula⁹. Pada masa ini, dapat dibedakan antara embrio yang masih hidup dan berkembang dengan baik, dengan embrio yang telah mengalami kematian atau penggumpalan.

Total jumlah embrio yang digunakan per kelompok perlakuan adalah 20 embrio. Jumlah ini mengacu pada OECD 236, yang menyebutkan minimal jumlah hewan coba embrio yg digunakan pada penelitian adalah 20, menggunakan well-plate 24, yang berisi 1 embrio per well.¹⁰ Total jumlah perlakuan juga ditentukan berdasarkan petunjuk OECD 236, yang mana apabila dibutuhkan dapat digunakan lebih dari satu control positif untuk dapat mengevaluasi efek masing-masing bahan uji terhadap embrio ikan zebra. Konsentrasi yang digunakan menggunakan satuan PPM agar lebih mudah dalam menyebutkan konsentrasi pajanan. Kemudian

setiap *well* yang telah berisi embrio dipajankan MAN dengan pengemulsi CMC pada konsentrasi tertentu.

Well-plate yang telah berisi embrio dan MAN tersebut kemudian dipindahkan ke inkubator untuk mempertahankan suhu ruang $26\pm 1^{\circ}\text{C}$. Suhu tersebut merupakan suhu yang telah terbukti optimal dalam mendukung pertumbuhan dan perkembangan embrio ikan zebra.¹⁰

Uji Toksisitas Minyak Atsiri Nilam

Nilam diperdagangkan dalam bentuk minyak, dan dikenal sebagai *patchouli oil*. Perbedaan komposisi dan jumlah komponen penyusun minyak dapat dipengaruhi oleh variabilitas dari subspecies tanaman yang berbeda, dan eksistensi *chemotype* yang berbeda.¹⁴ Minyak nilam digunakan dalam industri kosmetik, parfum, pemberi aroma pada pasta gigi, dan lain-lain. Penggunaan minyak nilam pada industri ini karena daya fiksasinya yang cukup tinggi terhadap bahan pewangi lain sehingga mencegah penguapan yang berlebihan pada zat pewangi lain.¹⁵

Minyak atsiri nilam yang dipajankan pada embrio ikan zebra, akan melalui *chorion* embrio sebagai *barrier* antara embrio dengan lingkungannya. *Chorion* akan melakukan *uptake* zat aktif, oksigen dan mineral yang ada pada lingkungan, sehingga zat aktif MAN yang telah diemulsikan bersama cairan embrionik akan ikut terserap oleh *chorion* embrio ikan zebra.¹⁶ Minyak atsiri nilam mengandung *Patchouli alcohol* (PA) yang merupakan *tricyclic sesquiterpene* dan terkandung dalam *Pogostemon cablin*. Aktifitas PA akan menekan aktifitas protein *Histone deacetylase 2* (HDAC2) sebagai pengatur ekspresi gen dan *cellular signaling*. Ekspresi gen C-myc merupakan salah satu target dari protein HDAC2. Ekspresi protein C-myc berkaitan dengan proliferasi dan pertumbuhan sel. NF- B merupakan target lain dari protein HDAC2 yang mengatur proliferasi dan apoptosis sel normal. Penekanan aktifitas protein HDAC2 akan menekan ekspresi C-myc sehingga akan meningkatkan ekspresi gen p21 dan menurunkan aktifitas *cyclin D1* dan *cyclin dependent kinase* (CDK) sehingga menekan pertumbuhan sel. Aktifitas HDAC2 yang tertekan oleh PA juga akan meningkatkan ekspresi NF- B pada subunit p53, yang mana akan menginduksi terjadinya apoptosis sel.^{17,18} Apoptosis yang diinduksi oleh MAN membutuhkan *adenosine triphosphate* (ATP) untuk membentuk protein-protein pro-apoptosis dan melangsungkan *cell* dan DNA *cleavage*. Proses apoptosis berlangsung secara luas dan berlebihan, mengakibatkan sel dan jaringan akan mengalami deplesi ATP dan menghambat *caspase 3* dan *9* yang akan mengaktifkan proses *Aponecrosis*.^{19,20} Seluruh proses kematian sel terjadi secara luas pada embrio ikan zebra, terutama pada 2 organ penting yang sedang mengalami pertumbuhan dan perkembangan, yaitu otak dan jantung. Minyak atsiri nilam dapat menyebabkan kematian pada sel-sel otak embrio dan menurunkan

denyut jantung embrio ikan zebra (Denta dan Nabillah, proses publikasi 2014). Keadaan tersebut menyebabkan fungsi fisiologis embrio ikan zebra dapat terganggu dan menyebabkan kematian embrio ikan zebra, yang dievaluasi melalui parameter *lethal concentration 50%* (LC50).

Pada kematian dengan mortalitas 100%, pajanan MAN dengan konsentrasi tinggi 5000 ppm tanpa pengemulsi dapat membunuh embrio, baik melalui proses apoptosis dan *aponecrosis* maupun akibat kurangnya pertukaran oksigen akibat minyak yang menutupi permukaan air dalam *well-plate*. Sementara pada perlakuan dengan mortalitas 0% atau mendekati, kematian tidak terjadi karena diduga kadar MAN yang minim menyebabkan MAN menjadi mudah menguap pada saat dipindahkan ke dalam *well-plate*, sehingga MAN tidak terpajan dengan optimal pada embrio ikan zebra. Selain itu, kemampuan embrio ikan zebra diduga masih dapat mempertahankan diri melalui proses regenerasi terhadap pajanan MAN yang minimal. Pada kelompok perlakuan dengan mortalitas mendekati dan mencapai 50%, diduga embrio mampu meregenerasi kerusakan jaringan yang terjadi akibat proses apoptosis dan *aponecrosis* oleh MAN. Hal ini mengakibatkan, tidak semua embrio mengalami kematian, namun ditemukan beberapa embrio yang mengalami malformasi pada *yolk-sac* dan *vertebra*. Hal ini konsisten terhadap hasil penelitian yang dilakukan Rimatmaja dan Ekasari (proses publikasi 2014). Kerusakan organ dan kematian embrio ikan zebra terjadi sejak pajanan pertama dilakukan, yaitu pada saat embrio ikan zebra memasuki fase blastula (2 jam pos fertilisasi). Pada fase tersebut, pembentukan organ belum terjadi, namun sudah terdapat prekursor pembentukan organ-organ penting, seperti jantung, ginjal, tulang, dan otak. Gangguan pembelahan sel pada fase blastula hingga segmentasi dapat menyebabkan defek pada organ embrio ikan zebra apabila pajanan lebih berat dari pada kemampuan regenerasi embrio ikan zebra. Kematian pada embrio dapat diamati berdasarkan hilangnya denyut jantung dan gambaran embrio yang jenuh, baik dengan *chorion* yang utuh maupun yang telah hancur.^{21,22}

Tabel 4. Tingkat Daya Racun Berdasarkan Nilai LC50²³

Nilai LC50	Tingkat Daya Racun
< 1 mg/L	Sangat tinggi
1 – 10 mg/L	Tinggi
10 – 100 mg/L	Sedang
> 100 mg/L	Ringan

Aktifitas MAN yang dapat menyebabkan apoptosis dan *aponecrosis* dapat dibuktikan pada kematian seluruh hewan coba dengan konsentrasi MAN 5000 ppm. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Rimatmaja

(proses publikasi 2014), konsentrasi 20 ppm dan 40 ppm MAN dapat menyebabkan gangguan pertumbuhan vertebra embrio ikan zebra yang signifikan. Hasil penelitian Utami (proses publikasi 2014) secara konsisten menyebutkan bahwa konsentrasi 40 ppm MAN yang dipajankan pada embrio ikan zebra dapat menurunkan denyut jantung embrio ikan zebra. Sementara pada konsentrasi MAN 120 ppm, MAN dapat membunuh 50% hewan coba, sehingga nilai LC50 MAN terhadap embrio ikan zebra adalah 120 ppm atau 120 mg/L, sehingga berdasarkan Tabel 4, MAN menunjukkan tingkat ketoksikan yang ringan terhadap embrio ikan zebra.

V. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil analisa data dan pembahasan pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. *Lethal concentration 50%* MAN pada embrio ikan zebra (*Danio rerio*) adalah 120 mg/L.
2. Minyak Atsiri Nilam memiliki ketoksikan yang relatif ringan dan layak untuk digunakan dengan konsentrasi <120 mg/L.

VI. SARAN

Penelitian mengenai toksisitas MAN perlu dikembangkan lebih lanjut agar pemanfaatan MAN sebagai bahan obat menjadi lebih optimal. Peneliti menyarankan agar dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengevaluasi ketoksikan subkronis dan kronis MAN. Sehingga dapat diketahui keamanan MAN apabila digunakan dalam jangka panjang.

VII. DAFTAR PUSTAKA

1. Miyazawa M, Okuno Y, Nakamura S, Kosaka H. Antimutagenic Activity of Flavonoids from *Pogostemon cablin*. *J. Agric. Food Chem* 2000; 48(): 642-647. pubs.acs.org (diakses 28 April 2014).
2. Kuntal Das, Nilesh K. Gupta, Vijayabhaskar S, Manjunath UM, Antimicrobial Potential of Patchouli Oil Cultivated Under Acidic Soil Zone Of South India. *Indian Journal of Novel Drug delivery* 2011; 3(2): 104-111.
3. Wu H, Li B, Wang X, Jin M, Wang G, Inhibitory Effect and Possible Mechanism of Action of Patchouli Alcohol against Influenza A (H2N2) Virus. *Molecules* 2011; 16(8): 6489-6501.
4. Kim HW, Cho SJ, Kim BY, Cho SI, Kim YK. *Pogostemon cablin* as ROS Scavenger in Oxidant-induced Cell Death of Human Neuroglioma Cell. *eCAM* 2010; 7(2): 239-247. creativescommon.org (diakses 7 Mei 2014).
5. Anonim. *Patchouli essential oil information*. <http://www.essentialoils.co.za/essential-oils/patchouli.htm#Precautions> (diakses 21 Mei 2014).
6. Li YC, Xian YF, Ip SP, Su ZR, Su JY, He JJ, Xie QF, Lai XP, Lin ZX. Anti-Inflammatory Activity of Patchouli Alcohol Isolated from *Pogostemonis Herba* in Animal Models. *Fitoterapia* 2011; 82(): 1295-1301. www.elsevier.com/locate/fitote (diakses 28 April 2014).
7. Chakrapani P, Venkatesh K, Chandra SSB, Arun JB, Kumar P, Amareshwari P, Rani AR. Phytochemical, Pharmacological importance of Patchouli (*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth) an aromatic medicinal plant. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 2013; 21(2): 7-15. www.globalresearchonline.net (diakses 12 Mey 2014).
8. Boyd CE. LC50 Calculations Help Predict Toxicity. *Sustainable Aquaculture Practices* 2005; (): 84-87. pdf.gaalliance.org/pdf/GAA-Boyd-Feb05.pdf (diakses 22 Mei 2014).
9. Nagel R. DarT: The Embryo Test with the Zebrafish *Danio rerio* - a General Model in Ecotoxicology and Toxicology. 2002; 09: 39-48.
10. OECD. *Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test*. OECD. No: 236, 2013.
11. Braunbeck T, Lammer E. *FISH EMBRYO TOXICITY ASSAYS*. Heidelberg, Germany: Aquatic Ecology & Toxicology, Department of Zoology, University of Heidelberg ; 2006. www.oecd.org (accessed 28 April 2014).
12. Anonymous. Emulsions: Preparation and Stabilization. <http://pharmlabs.unc.edu/labs/emulsions/bottle.htm> (accessed 20 September 2014).
13. Abbot WS. A method of computing the effectiveness of an insecticides. *Journal of Economic Entomology* 1925; 18(2): 265-267.
14. Nickavar B, Mojab R, Dolat AR. Analysis Essential Oil of Two Thymus Species From Iran. *J Food Chemistry* 2004; 90(): 609-611.
15. Guenther E. *Essential Oils*, Volume II ed. New York: Van Nostrand Reinhold; 1949.
16. Hsu, C.H., Wen, Z.H., Lin, C.S., Chakraborty, C., 2007. The Zebrafish Model: Use in Studying Cellular Mechanisms for a Spectrum of Clinical Disease Entity. *Curr Neurovascular res*. Vol 4. Pp 111-120.
17. Jitareanu A, Padureanu S, Tataringa G, Tuchilus C, Stanescu U. Evaluation of phytotoxic and mutagenic effects of some cinnamic acid derivatives using the Triticum test. *Turkish Journal of Biology* 2013; 37(): 748-756.
18. Jeong JB, Choi J, Lou Z, Jiang X, Lee SH. Patchouli alcohol, an essential oil of *Pogostemon*

- cablin, exhibits anti-tumorigenic activity in human colorectal cancer cells. *International Immunopharmacology* 2013; 16(): 184-190.
19. Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, Nicotier P. Intracellular Adenosine Triphosphate (ATP) Concentration: A Switch in the Decision Between Apoptosis and Necrosis. *J. Exp. Med.* 1997; 185(8): 1481-1486.
 20. Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and Necrosis in the Liver: A Tale of Two Deaths?. *J. Hepatology* 2006; 43(2): 31-44.
 21. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Developmental Dynamics* 1995; 203(3): 253-310.
 22. Poss KD, Keating MT, Nechiporuk A. Tales of Regeneration in Zebrafish. *Developmental Dynamics* 2003; 226(3): 202-210.
 23. Koesoemadinata. Pedoman Umum Pengujian Laboratorium Toksisitas Lethal Pestisida pada Ikan untuk Keperluan Pendaftaran. Komisi Pestisida Departemen Pertanian, Jakarta, 1983; 24 hlm.