

UJI TOKSISITAS MINYAK ATSIRI DAUN TENGGULUN (*Protium javanicum* Burm. F.) DENGAN METODE BRINE SHRIMP LETHALITY TEST (BSLT)

Ni Luh Putu Putri Setianingsih, I Wayan Suirta, dan Ni Made Puspawati

Jurusan Kimia, FMIPA Universitas Udayana

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian tentang uji toksisitas minyak atsiri dari daun tenggulun muda dan tua (*Protium Javanicum* Burm. F.) dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) serta analisis kandungan senyawa atsirinya dengan metode kromatografis-spektrometer massa (GC-MS). Minyak atsiri dari daun tenggulun muda dan tua didapat dengan proses destilasi uap. Hasil destilasi uap minyak atsiri daun tenggulun muda dengan rendemen 0,06 % dan daun tenggulun tua dengan rendemen 0,07%. Hasil uji toksisitas dengan larva udang *Artemia salina* Leach menunjukkan minyak atsiri daun tenggulun tua lebih toksik dengan LC₅₀ 15,85 ppm dibandingkan dengan minyak atsiri daun tenggulun muda dengan LC₅₀ 25,12 ppm. Hasil analisis data GC-MS minyak atsiri daun tenggulun muda mengandung 11 komponen yaitu, α -pinen (0,75 %), β -pinen (0,54 %), delta-3-carene (0,38 %), oktatrien (1,35%), *trans*- β -ocimen (77,63 %), β -elemen (1,23 %), *trans*-kariofilen (12,62 %), α -humulen (1,18 %), germacren (3,25 %), etanon (0,65 %) dan isopatulenol (0,42 %) sedangkan minyak atsiri daun tenggulun tua mengandung 21 komponen yaitu, α -pinen (0,71 %), β -pinen (0,44 %), β -mircen (0,15 %), *cis*-ocimen (2,06 %), *trans*- β -ocimen (52,79 %), *trans*-kariofilen (30,02 %), α -humulen (2,80 %), germacren (0,28 %), germacren (4,64 %), α -farnesen (0,85 %), β -elemen (0,16 %), tridecatrienitril (0,19 %), etanon (0,49 %), kariofilen oksida (0,83 %), nerolidol (0,12 %), spatulenol (1,25 %), isopatulenol (1,18 %), kauran (0,30 %), isopatulenol (0,16 %), spatulenol (0,34 %) dan α -farnesen (0,23 %).

Kata kunci: *Protium javanicum* Burm. F., minyak atsiri, toksisitas, *Artemia salina* Leach

ABSTRACT

Toxicity of essential oils extracted from young and old leaves of Tenggulun (*Protium javanicum*, Burm) towards *Artemia salina* leach larvae has been evaluated using Brine Shrimp Lethality Test and their chemical compositions have been analyzed using Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). The essential oils were obtained by extracting fresh young and old leaves of Tenggulun using steam distillation method. Steam distillation of young leaves produced oils with 0.06% yield while old leaves yielded 0.07 % oils. The toxicity test results found that the essential oils obtained from old leaves were more toxic with LC₅₀ of 15.85 compared to the essential oils of young leaves whose LC₅₀ was 25.12 ppm. GC-MS data revealed that the essential oils of young leaves contained 11 compounds which were : α -pinene (0.75 %), β -pinene (0.54 %), delta-3-carene (0.38 %), octatriene (1.35%), *trans*- β -ocimene (77.63 %), β -elemene (1.23 %), *trans*-caryophyllene (12.62 %), α -humulene (1.18 %), germacrene (3.25 %), ethanone (0.65 %) and isospathulenol (0.42 %) while the essential oils of old leaves composed of 21 compounds which were : α -pinene (0.71 %), β -pinene (0.44 %), β -myrcene (0.15 %), *cis*-ocimene (2.06 %), *trans*- β -ocimene (52.79 %), *trans*-caryophyllene (30.02 %), α -humulene (2.80 %), germacrene (0.28 %), germacrene (4.64 %), α -farnesene (0.85 %), β -elemene (0.16 %), tridecatrienitrile (0.19 %), ethanone (0.49 %), caryophyllene oxide (0.83 %), nerolidol (0.12 %), spathulenol (1.25 %), isospathulenol (1.18 %), kauran (0.30 %), isospathulenol (0.16 %), spathulenol (0.34 %) and α -farnesene (0.23 %).

Keywords: *Protium javanicum* Burm. F., essential oils, toxicity, *Artemia salina* Leach

PENDAHULUAN

Obat tradisional terutama obat herbal cukup manjur untuk mengobati berbagai penyakit. Pengobatan tradisional secara umum dinilai lebih aman daripada pengobatan modern. Hal ini disebabkan karena obat tradisional memiliki efek samping yang relatif lebih sedikit dibanding obat modern (Mangan, 2003).

Tenggulun (*Protium javanicum* Burm. F.) merupakan salah satu contoh tumbuhan berkhasiat dalam pengobatan secara tradisional. Daun tenggulun dapat digunakan sebagai obat sakit perut, obat batuk, dan menyembuhkan diare. Daun tenggulun dilaporkan mengandung senyawa golongan terpenoid, steroid, flavonoid, tannin dan minyak atsiri (Eniek, 1997). Beberapa jenis senyawa atsiri dapat digunakan sebagai bahan terapi (aromaterapi) dan sebagai bahan obat (Heyne, 1987).

Penelitian yang telah dilakukan oleh Sanjaya (2002) diketahui bahwa minyak atsiri pada daun tenggulun mengandung senyawa cinnamil tiglat dan miristofenon serta memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Selain itu, hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Sukmajaya (2012) diketahui minyak atsiri pada daun tenggulun mengandung senyawa sebagai agent antiinflamasi.

Salah satu metode untuk skrining awal bahan-bahan yang bersifat sitotoksik adalah dengan uji toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach (Steven M., 1993). Salah satu spesies tumbuhan dari genus *Protium* yang diketahui bersifat sitotoksik terhadap larva udang *Arthemia salina* Leach yaitu dari *protium heptaphylum* (Rudiger, 2007).

Alluri V. K. Et. al. (2005) telah meneliti toksisitas beberapa tumbuhan obat di India dari famili Burseraceae pada spesies *Boswellia serrata*, *Commiphora wightii*, dan *Commiphora myrrha* dengan uji sitotoksitas larva udang *Artemia salina* Leach. Hasil uji sitotoksik didapat nilai LC₅₀ (µg/mL, 24 jam) pada spesies *Boswellia serrata* sebesar 18, *Commiphora wightii* sebesar 1.600, dan *Commiphora myrrha* sebesar >5.000. Pada spesies *Boswellia serrata* dan *Commiphora wightii* yang diteliti adalah bagian resin dan *Commiphora myrrha* pada

oleoresin. Ketiga spesies tumbuhan dapat dimanfaatkan sebagai bahan obat antiinflamasi, antirematik, dan antiastamatik.

Sejauh ini belum pernah dilaporkan sehingga uji toksisitas minyak atsiri daun tenggulun (*Protium javanicum* Burm. F.) terhadap larva udang *Artemia salina* Leach perlu dilakukan penelitian untuk menguji toksisitasnya pada daun muda dan tua karena kemungkinan ada perbedaan komposisi kimianya berdasar hasil proses metabolit sekunder pada tumbuhan tersebut.

MATERI DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun tenggulun (*Protium javanicum* Burm. F.) yang sebelumnya sudah di determinasi di UPT LIPI Kebun Raya Eka Karya Bedugul, Tabanan, Bali pada bulan Desember 2012. Sebagai hewan uji untuk uji toksisitas digunakan larva udang (*Artemia salina* Leach). Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini antara lain etanol 96%, kalsium klorida anhidrat p.a, natrium klorida p.a., dimetilsulfoksida/DMSO.

Peralatan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain gelas beker, gelas ukur, botol vial, botol semprot, labu ukur, corong kaca, corong pemisah, pipet volume, pipet tetes, pipet mikro, aluminium foil, kertas saring, spatula, pisau, neraca elektronik, akuarium, seperangkat alat destilasi uap dan seperangkat alat kromatografi gas-spektrometer massa (GC-MS) Shimadzu QP2010S.

Cara Kerja

Penyiapan bahan

Sampel daun tenggulun (*Protium javanicum* Burm. F.) diambil di kampus Universitas Udayana, Bukit Jimbaran pada bulan Februari 2013. Daun yang muda diambil pada bagian pucuk sampai bagian ketiga dari pucuk. Sementara itu, pada daun tua diambil pada bagian keempat sampai bagian paling bawah dari

ranting. Daun yang sudah terkumpul dicuci bersih menggunakan air, kemudian dipotong menjadi bagian-bagian kecil. Sampel yang digunakan dalam destilasi uap daun tenggulun muda dan daun tenggulun tua menggunakan jaringan yang segar dengan tujuan agar komponen minyak atsiri yang terkandung dalam sampel tidak mengalami perubahan susunan senyawa akibat proses oksidasi yang dapat mempengaruhi kualitas minyak.

Isolasi minyak atsiri dengan destilasi uap

Daun tenggulun muda yang masih segarseberat 4,5 kg dan daun tenggulun tua yang masih segar seberat 7,0 kg didestilasi uap dengan alat destilasi uap. Masing-masing minyak atsiri yang diperoleh kemudian ditimbang untuk menentukan rendemennya, dilakukan uji toksistas terhadap larva udang (*Artemia salina* Leach), kemudian dianalisis dengan GC-MS.

Uji Toksisitas terhadap larva udang Artemia salina Leach

Minyak atsiri daun tenggulun muda dan daun tua yang diperoleh diuji toksistasnya dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach berdasarkan prosedur yang dikembangkan oleh Meyer (1982). Pengamatan dilakukan selama terhadap kematian larva udang *Artemia salina* Leach selama 24 jam dan nilai (LC₅₀) dihitung dengan membuat grafik % mortalitas dengan log konsentrasi dengan menggunakan metode Reed-Muench.

Analisis kandungan kimia minyak atsiri dengan kromatografi gas-spektroskopi massa (GC-MS)

Komponen kimia penyusun minyak atsiri dianalisis dengan GC-MS Shimadzu QP2010S, jenis kolom rastek stabilwakR-DA, gas pembawa yaitu helium, dengan tipe ion EI-70 Ev, temperatur kolom 60°C, temperatur injeksi 215°C, dengan mode injeksi yaitu split, tipe aliran kontrol adalah tekanan sebesar 57,4 kPa; total aliran 20 mL per menit, dengan aliran kolom 1 mL per menit, temperatur sumber ion

200°C dan temperatur antar muka 215°C. Identifikasi dilakukan dengan membandingkan spektrum massa dari minyak atsiri yang dihasilkan dengan spektrum massa dari database yang telah terprogram pada database GC-MS (WILEY229.LIB)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi minyak atsiri daun tenggulun muda dan daun tenggulun tua dengan metode destilasi uap

Isolasi 4,5 kg daun tenggulun muda dengan destilasi uap menghasilkan 2,8406 g minyak atsiri yang berwarna kuning muda, berbau asam dengan volume 3,30 mL dan rendemen sebesar 0,06 %. Sementara itu, hasil destilasi uap 7,0 kg daun tenggulun tua menghasilkan 4,6711 g minyak atsiri yang berwarna kuning tua, berbau asam dengan volume minyak 5,20 mL dan rendemen sebesar 0,07 %. Rendemen yang didapat menunjukkan tidak adanya perbedaan terhadap kandungan minyak atsiri antara daun tenggulun muda dengan daun tenggulun tua. Daun tenggulun muda dan daun tenggulun tua mempunyai bau yang sama.

Uji toksistas minyak atsiri daun tenggulun muda dan tua terhadap larva udang Artemia salina Leach

Hasil uji toksistas minyak atsiri daun tenggulun muda dan tua terhadap larva udang *Artemia salina* Leach disajikan dalam Tabel 2, Gambar 1, dan Gambar 2. Tabel 2 menunjukkan bahwa minyak atsiri daun tenggulun muda mempunyai nilai LC₅₀ 25,12 ppm, sedangkan minyak atsiri daun tenggulun tua mempunyai nilai LC₅₀ 15,85 ppm, sehingga dapat dikatakan bahwa minyak atsiri daun tenggulun muda dan tua bersifat toksik karena menurut Meyer (1982), suatu bahan dikatakan bersifat toksik apabila mempunyai nilai LC₅₀ < 1000 ppm berpotensi untuk dikembangkan sebagai antikanter.

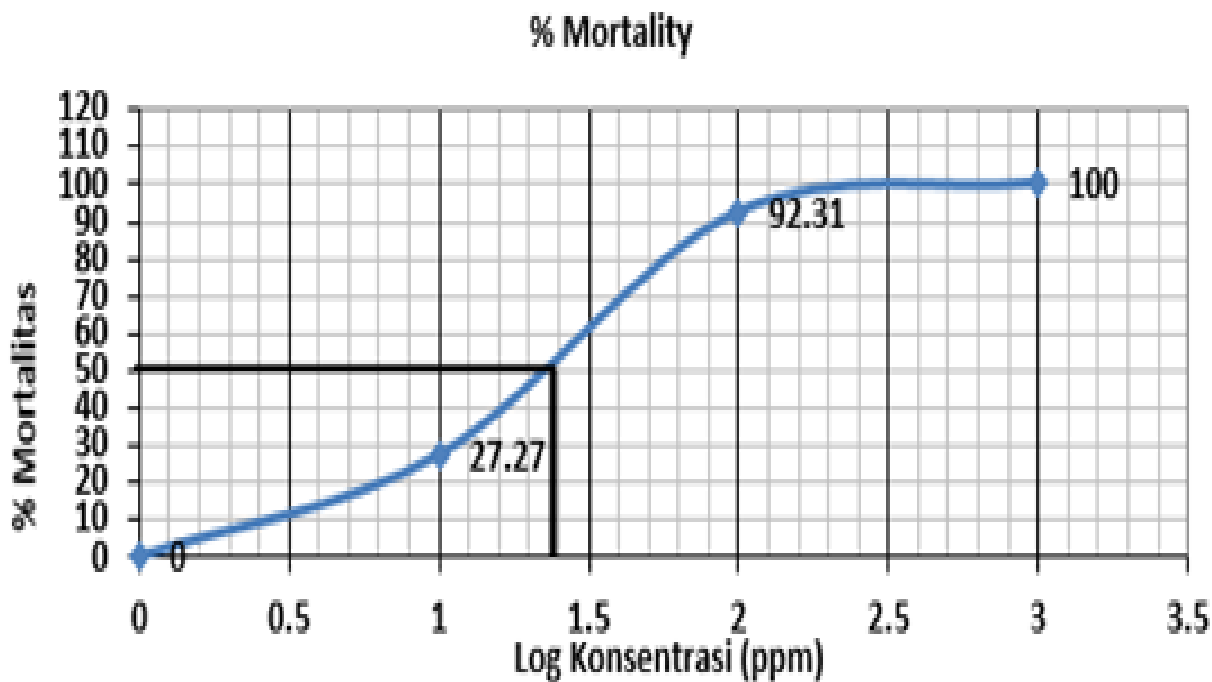
Tabel 1. Hasil isolasi minyak atsiri daun tenggulun muda dan tua dengan destilasi uap

Jenis Daun	Jumlah Sampel (kg)	Berat Minyak (g)	Volume Minyak (mL)	Warna Minyak	% Rendemen (b/b)
Daun tenggulun muda	4,5	2,8406	3,30	Kuning Muda	0,06
Daun tenggulun tua	7,0	4,6711	5,20	Kuning Tua	0,07

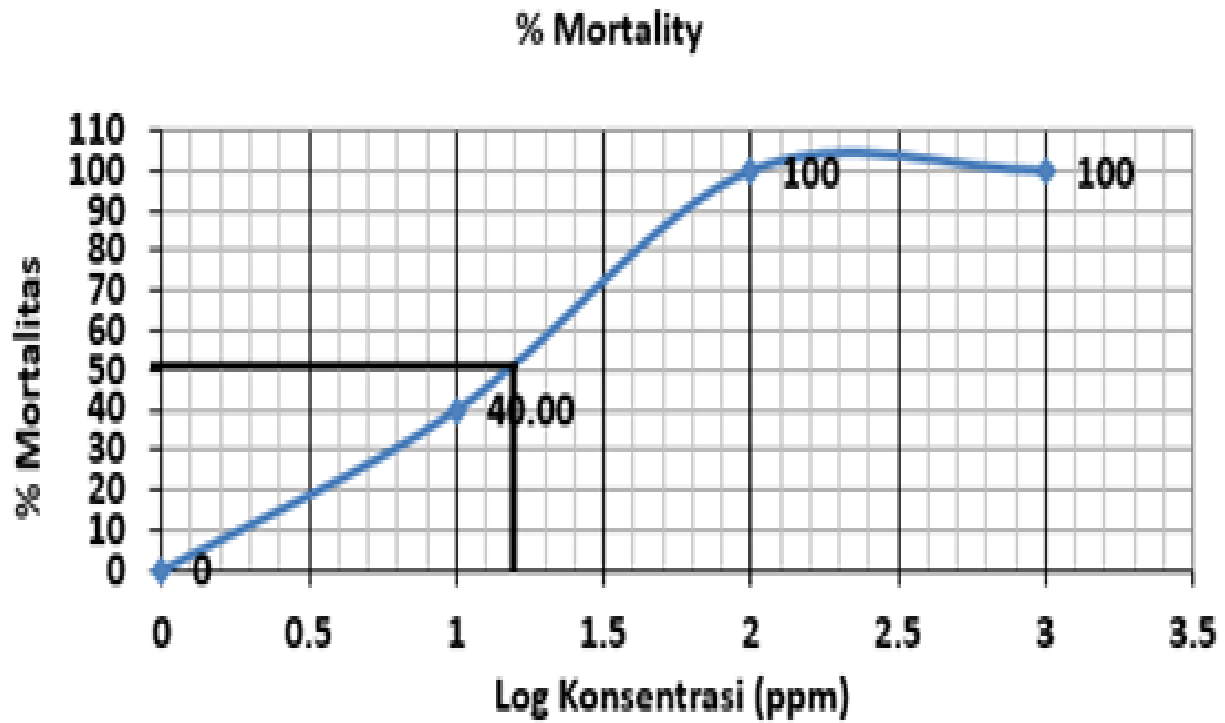
Tabel 2. Hasil uji toksistas minyak atsiri daun tenggulun muda dan tua terhadap larva udang *Artemia salina* Leach

Jenis Daun	Konsentrasi (ppm)	Jumlah Larva	Jumlah Larva Udang Yang Mati Setelah 24 Jam (Tiga Kali Pengulanagn)			Mortalitas (%)	LC50 (ppm)
			I	II	III		
Daun Tenggulun Muda	0	10	0	0	0	0 %	25,12
	10	10	4	2	4	27,27 %	
	100	10	9	8	9	92,31%	
	1000	10	10	10	10	100 %	
Daun Tenggulun Tua	0	10	0	0	0	0 %	15,85
	10	10	4	5	4	40,00 %	
	100	10	9	10	10	100 %	
	1000	10	10	10	10	100 %	

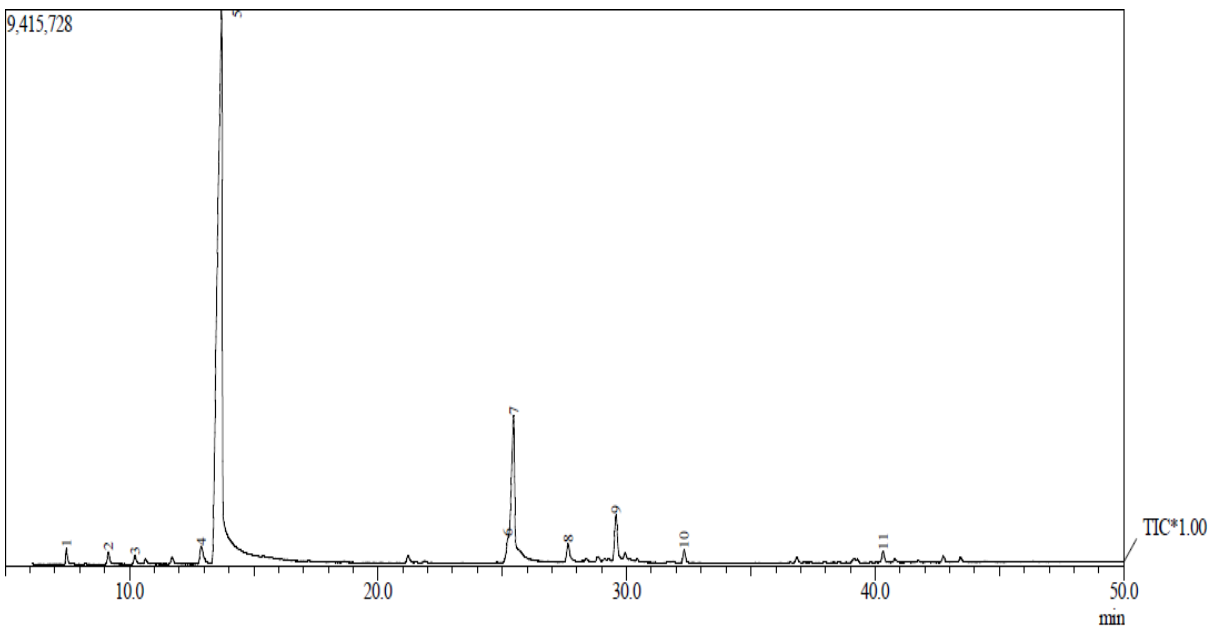
Keterangan:LC₅₀=Konsentrasi yang menyebabkan 50 % kematian larva udang *Artemia salina* Leach



Gambar 1. Grafik % mortalitas vs log konsentrasi minyak atsiri daun tenggulun muda



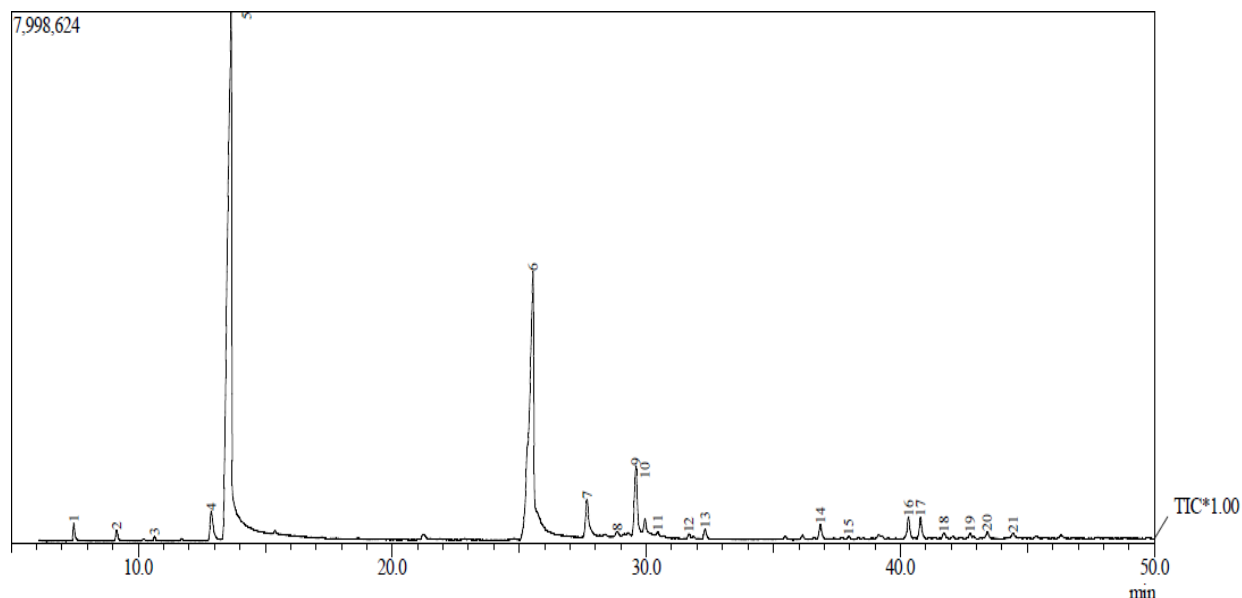
Gambar 2. Grafik % mortalitas vs log konsentrasi minyak atsiri daun tenggulun tua



Gambar 3. Kromatogram minyak atsiri daun tenggulun muda

Tabel 3. Senyawa-senyawa atsiri pada daun tenggulun muda berdasarkan Database WILEY229.LIB

No.	Puncak Senyawa	M ⁺	Waktu Retensi	% Area	Senyawa Dugaan	Golongan Senyawa
1	Puncak 1	136	7,464	0,75	α -pinen	Monoterpen
2	Puncak 5	136	13,708	77,63	<i>Trans</i> - β -ocimen	Monoterpen
3	Puncak 6	204	25,225	1,23	β -elemen	Seskuiterpen
4	Puncak 7	204	25,454	12,62	<i>Trans</i> -kariofilen	Seskuiterpen
5	Puncak 8	204	27,647	1,18	α -humulen	Seskuiterpen
6	Puncak 9	204	29,575	3,25	Germacren	Seskuiterpen



Gambar 4. Kromatogram minyak atsiri daun tenggulun tua

Analisis kandungan kimia minyak atsiri daun tenggulun muda

Kromatogram hasil isolasi minyak atsiri daun tenggulun muda menghasilkan sebelas puncak senyawa yaitu, α -pinen (0,75 %), β -pinen (0,54 %), delta-3-carene (0,38 %), oktatrien (1,35%), *trans*- β -ocimen (77,63 %), β -elemen (1,23 %), *trans*-kariofilen (12,62 %), α -humulen (1,18 %), germacren (3,25 %), etanon (0,65 %) dan isopatulenol (0,42 %) seperti yang ditunjukkan pada Gambar 3.

Berdasarkan pendekatan database (WILEY229.LIB) spektrum massa masing-masing puncak dengan spektrum massa senyawa-senyawa yang sudah diketahui dan terprogram dalam database, maka diduga senyawa-senyawa atsiri penyusun minyak atsiri daun tenggulun muda seperti pada Tabel 3.

Analisis kandungan kimia minyak atsiri daun tenggulun tua

Kromatogram minyak atsiri daun tenggulun tua (Gambar 4) menunjukkan adanya dua puluh satu senyawa yaitu, α -pinen (0,71 %), β -pinen (0,44 %), β -mircen (0,15 %), *cis*-ocimen (2,06 %), *trans*- β -ocimen (52,79 %), *trans*-kariofilen (30,02 %), α -humulen (2,80 %), germacren (0,28 %), germacren (4,64 %), α -farnesen (0,85 %), β -elemen (0,16 %), tridecatrienitril (0,19 %), etanon (0,49 %), kariofilen oksida (0,83 %), nerolidol (0,12 %), spatulenol (1,25 %), isopatulenol (1,18 %), kauran (0,30 %), isopatulenol (0,16 %), spatulenol (0,34 %) dan α -farnesen (0,23 %) seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4

Tabel 4. Senyawa-senyawa atsiri pada tenggulun tua berdasarkan Database WILEY229.LIB

No.	Puncak Senyawa	M ⁺	Waktu Retensi	% Area	Senyawa Dugaan	Golongan Senyawa
1	Puncak 1	136	7,465	0,71	α -pinen	Monoterpen
2	Puncak 5	136	13,655	52,79	<i>Trans</i> - β -ocimen	Monoterpen
3	Puncak 6	204	25,537	30,02	<i>Trans</i> -kariofilen	Seskuiterpen
4	Puncak 7	204	27,665	2,80	α -humulen	Seskuiterpen
5	Puncak 9	204	29,590	4,64	Germacren	Seskuiterpen
6	Puncak 11	204	30,441	0,16	β -elemen	Seskuiterpen
7	Puncak 14	220	36,851	0,83	Kariofilen Oksida	Seskuiterpen
8	Puncak 16	220	40,320	1,25	Spatulenol	Seskuiterpen

Berdasarkan pendekatan database (WILEY229.LIB) spektrum massa masing-masing puncak dengan spektrum massa senyawa-senyawa yang sudah diketahui dan terprogram dalam database, maka diduga senyawa-senyawa atsiri penyusun minyak atsiri daun tenggulun muda seperti pada Tabel 4.

Minyak atsiri pada daun tenggulun muda dan tua sebagian besar tersusun atas komponen monoterpen dan seskuiterpen. Komponen senyawa penyusun minyak atsiri pada daun tenggulun muda dan tua menunjukkan adanya perbedaan, dimana daun tenggulun muda ada 6 komponen sedangkan daun tenggulun tua 8 komponen. Perbedaan kandungan yang didapatkan kemungkinan disebabkan karena pada daun tenggulun muda senyawa kariofilen oksida dan spatulenol belum terbentuk. Perbedaan komponen senyawa atsiri dan perbedaan kadar senyawa atsirinya antara daun tenggulun muda dan daun tenggulun tua memberikan perbedaan sifat toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach. Daun tenggulun tua lebih bersifat toksik dibandingkan dengan daun tenggulun muda disebabkan oleh kadar senyawa *trans*-kariofilen pada daun tenggulun tua jauh lebih besar dari daun tenggulun muda sehingga berpotensi sebagai senyawa antikanker. Hal ini didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Leqault J. (2007) dimana dilaporkan β -kariofilen memperlihatkan aktifitas antikanker pada sel kanker MCF-7, SLJJ-1 dan L-929.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

1. Daun tenggulun muda memiliki rendemen sebesar 0,06 %. Sementara itu, pada daun tenggulun tua memiliki rendemen sebesar 0,07 %. Minyak atsiri daun tenggulun tua dengan LC₅₀ 15,85 ppm bersifat lebih toksik dibandingkan dengan minyak atsiri daun tenggulun muda dengan LC₅₀ 25,12 ppm.
2. Hasil analisis dengan kromatografi gas-spektrometer massa (GC-MS) menunjukkan pada daun tenggulun muda mengandung senyawa atsiri yang terdiri dari α -pinen (0,75 %), *trans*- β -ocimen (77,63 %), β -elemen (1,23 %), *trans*-kariofilen (12,62 %), α -humulen (1,18 %) dan germacren (3,25 %). Sementara itu, pada daun tenggulun tua mengandung senyawa atsiri yang terdiri dari α -pinen (0,71 %), *trans*- β -ocimen (52,79 %), *trans*-kariofilen (30,02 %), α -humulen (2,80 %), germacren (4,64 %), β -elemen (0,16 %), kariofilen oksida (0,83 %) dan spatulenol (1,25 %).

Saran

Saran dalam penelitian ini adalah perlu dilakukan uji aktivitas antikanker secara *invivo* dan *invitro* pada minyak atsiri daun tenggulun (*Protium javanicum* Burm. F.).

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada Bapak Ir. I Ketut Sumiarta, M.Agr. dan Sukmajaya serta kepada semua pihak yang telah membantu demi kelancaran penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Alluri V. K., Tayi V. N. R., Dodda S., Mulabagal V., Hsin-Sheng T., and Gottumukkala V. S., 2005, Assessment of Bioactivity of Indian Medical Plants Using Brine Shrimp (*Artemia salina*) Lethality Assay, *J. Applied Science and Engineering*, 3 (2) : 125-134
- Eniek Kriwiyanti, 1997, *Identifikasi, Struktur Anatomi dan Studi Pendahuluan Golongan Senyawa Kimia Daun Pelengkap Bumbu Lawar dan Betutu*, Fakultas MIPA, Universitas Udayana, Bukit Jimbaran
- Heyne, K., 1987, *Tumbuhan Berguna Indonesia II*, Edisi II, Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan, Departemen Kehutanan, Jakarta
- Leqault, J. and Pichette, A., 2007, *Potentiating Effect of Beta-Caryophyllene on Anticancer Activity of Alpha-Humulene, Isocaryophyllene and Paclitaxel*, 59 (12) : 1643-7
- Mangan, Y., 2003, *Solusi Sehat Mencegah dan Mengatasi Kanker*, PT Agromedia Pustaka, Jakarta
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., and Mclaughlin, J. L., 1982, Brinh Shrimp : a convenient general biosay for active plant constituents, *Planta Medica*, 45 : 31-34
- Rudiger, A. L., Siani, A. C., and Vega J. V. F., 2007, The Chemistry and Pharmacology of the South American genus *Proteum* Burm. F. (Bursraceae), *J. Pharmacogn Review*, 1 (1) : 93-104
- Sanjaya, I. M. A., 2002, Isolasi dan identifikasi Senyawa Atsiri Yang Memiliki Aktivitas Antibakteri pada Daun Tenggulun (*Protium javanicum* Burm. F.), *Skripsi*, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana, Bukit Jimbaran
- Steven, M. C and Russell, J. M., 1993, *Bioactive Natural Products : detection, isolation, and structural determination*, CRC Press, America
- Sukmajaya, A. P. I G. P., N. M. Puspawati, dan A. A. Bawa Putra, 2012, Analisis Kandungan Minyak Atsiri Daun Tenggulun (*Protium javanicum* Burm. F.) dengan Metode Kromatografi Gas-Spektroskopi Massa, *Jurnal Kimia*, 6 (2) : 155-162