

## ANALISIS AKTIVITAS TOKSISITAS BEBERAPA MINYAK ATSIRI DENGAN METODE BRINE SHRIMP LETHALITY TEST

Marsah Rahmawati Utami<sup>1\*</sup>, Yusi Ardiyanti<sup>2</sup>

<sup>1,2</sup>Universitas Singaperbangsa Karawang

\*Korespondensi: Jl. HS.Ronggo Waluyo Telukjambe Karawang, Email: marsah.r.utami@gmail.com

### ABSTRAK

**Latar Belakang:** Minyak atsiri biasa digunakan sebagai bahan baku minyak wangi, obat-obatan dan kosmetik. Dalam bidang farmasi, minyak atsiri digunakan sebagai antibakteri, anti nyeri dan anti infeksi. Efek farmakologis ini berhubungan dengan metabolit sekunder yang terkandung dalam minyak atsiri tersebut. Efektifitas komponen-komponen aktif metabolit sekunder sebagai obat dapat ditentukan dengan analisis toksisitas sebagai uji pendahuluan. Analisis toksisitas yang biasa digunakan yaitu dengan *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Uji ini menggambarkan tingkat ketoksikan ekstrak terhadap larva *Artemia salina*. Hasil uji ini dapat dimanfaatkan sebagai uji pendahuluan untuk mengidentifikasi bioaktivitas tanaman yang lebih luas.

**Tujuan Penelitian:** Penelitian ini bertujuan menganalisis aktivitas toksisitas minyak atsiri daun kemanggi, rimpang lengkuas dan daun sirih merah serta kandungan senyawa kimianya.

**Metode:** Minyak atsiri diisolasi dengan metode destilasi uap, diuji aktivitas toksisitasnya dengan metode BSLT, dan kandungan senyawa kimia dianalisis dengan GC-MS.

**Simpulan:** Hasil uji *Brine Shrimp Lethality Test* menunjukkan bahwa minyak atsiri daun kemanggi, rimpang lengkuas, dan sirih merah memiliki tingkat toksisitas dengan LC50 secara berturut-turut adalah 57,21 ppm, 110,01 ppm, 360,51 ppm. Berdasarkan hasil analisis GC-MS komponen utama senyawa penyusun minyak atsiri daun kemanggi adalah lemonal dan beta citral, komponen utama minyak atsiri rimpang lengkuas adalah 2,6-dimetilfenil borat, 1,8-cineol, sedangkan komponen utama senyawa penyusun minyak atsiri sirih merah adalah sabinena dan beta mircena.

**Kata kunci:** Minyak atsiri, Destilasi uap, *Brine Shrimp Lethality Test*

### ABSTRACT

**Background:** Essential oils are commonly used as raw materials for fragrance oils, medicines and cosmetics. In the pharmaceutical field, essential oils are used as antibacterial, anti-pain and anti-infection. This pharmacological effect is related to secondary metabolites contained in the essential oil. The effectiveness of the active components of secondary metabolites as a drug can be determined by toxicity analysis as a preliminary test. Toxicity analysis that is commonly used is the Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). This test illustrates the level of toxicity of extracts against *Artemia salina* larvae. The results of this test can be used as a preliminary test to identify broader plant bioactivity.

**Objective:** The aim of this study was to analyze the toxicity activities of basil leaf essential oils, galangal rhizome and red betel leaf and their secondary metabolite content.

**Method:** Essential oils were isolated by the steam distillation method, their toxicity activity was tested by the BSLT method, and the contents of the chemical compounds were analyzed by GC-MS.

**Conclusion:** Brine Shrimp Lethality Test results showed that the essential oils of the leaves of the kemanggi, galangal rhizome, and red betel have a level of toxicity with LC50 respectively 57.21 ppm, 110.01 ppm, 360.51 ppm. Based on the results of GC-MS analysis, the main components of the kemanggi leaf essential oil are lemonal and beta citral, the main components of galangal rhizome essential oil are 2,6-dimethylphenyl borate and 1,8-cineol, while the main components of the red betel essential oil are sabinena and beta mircena.

**Keywords:** essential oil, water distillation, Brine Shrimp Lethality Test

### PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara yang kaya akan bahan baku minyak atsiri dan

menjadi salah satu produsen minyak atsiri terbesar di dunia. Dengan semakin meningkatnya kebutuhan pasar dunia terhadap minyak atsiri, pemerintah memasukan kelompok minyak atsiri dalam 10 besar komoditi ekspor Indonesia (kemendag, 2014). Kebutuhan pasar yang tinggi menunjukan, Minyak atsiri disebut juga dengan nama minyak eteris (*aetheric oil*), minyak esensial (*essential oil*), minyak aromatik (*aromatic oil*) atau minyak terbang (*volatile oil*) yang dihasilkan oleh tanaman. Minyak atsiri memiliki sifat mudah menguap,tidak polar, tidak larut dalam air dan pelarut polar lainnya.

Secara tradisional minyak atsiri sering digunakan sebagai bumbu pemberi citarasa makanan dan minuman, aromaterapi, kosmetik, dan bahan pewangi. Selain itu minyak atsiri juga sering digunakan sebagai bahan aditif serta pengawet makanan dan minuman, antiinflamasi, antioksidan, antiseptik, antiserangga, serta obat berbagai jenis penyakit pada manusia dan hewan (Burt, 2007; Dubey et al., 2010; Koul et al., 2008; Rajkumar & Jebanesan, 2007; Reichling, 2009). Pada saat ini minyak atsiri telah banyak digunakan secara luas di berbagai jenis industri bahan-bahan kebutuhan rumah tangga, kosmetik, makanan dan minuman, farmasi obat-obatan, parfum, pestisida dan sebagainya (Isman, 2000; Koul et al., 2008). Minyak atsiri juga mempunyai peluang untuk dikembangkan menjadi produk-produk derivat lainnya seperti pestisida. Pengembangan produk-produk derivat dari minyak atsiri diharapkan dapat mengurangi atau menggantikan produk-produk yang berasal dari bahan kimia sintetik ( Hartati SY, 2012).

Kemangi, lengkuas dan sirih merah adalah beberapa tanaman yang mengandung minyak atsiri, dan banyak dikonsumsi oleh masyarakat indonesia baik sebagai lalapan, penambah rasa atau pun obat tradisional. Meski telah banyak penelitian yang dilakukan terhadap tanaman tersebut, namun penelitian mengenai bioaktivitas minyak atsiri ketiga tanaman ini masih sedikit, terutama aktivitas toksisitasnya. Salah satu metode

untuk menentukan aktivitas toksisitas adalah Metode *Brine Shrimp Lethality Test*, BS LT merupakan suatu uji toksisitas yang menggunakan hewan uji Artemia salina. Artemia salina digunakan sebagai alternatif untuk uji toksisitas biologis ekstrak herbal dan tes ini berkorelasi signifikan dengan beberapa model hewan lainnya (Hamidi, Jovanova, dan Panovska, 2014), Metode BS LT dapat digunakan sebagai uji pendahuluan untuk mengetahui adanya biokativitas tanaman (zuraida, 2018). Uji ini dapat digunakan untuk menentukan bioaktivitas tanaman seperti aktivitas sitotoksik, fototoksik, pestisida, inhibisi enzim, dan regulasi ion (Veni & Pushpanathan, 2014). Keunggulan dari uji BS LT ini yaitu sederhana, cepat, mudah, hasilnya dapat diulang, serta tidak mahal (Hamidi, Jovanova, dan Panovska, 2014).

## METODE PENELITIAN

### 1. Isolasi Minyak Atsiri dengan Destilasi Uap

Setelah tanaman dideterminasi di Herbarium Bogoriense Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor, Tanaman didestilasi dengan cara destilasi uap. Distilat minyak atsiri yang diperoleh disimpan di dalam refrigerator, untuk diidentifikasi dengan GC-MS dan diuji aktivitas toksisitasnya.

### 2. Uji Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) Penetasan telur

Telur udang ditempatkan pada gelas piala berisi air laut yang diberi aerasi dan penerangan.Kemudian dibiarkan selama 48 jam. Telur akan menetas dalam 48 jam dan larva siap di uji

#### Penyiapan sampel uji

Minyak atsiri dilarutkan dalam air laut dengan penambangan DMSO sebagai surfaktan dan dibuat konsentrasi 10.000 ppm sebagai larutan induk dalam labu takar 5 ml. Kemudian dilakukan pengenceran dengan dibuat larutan 2000 ppm, 1000 ppm, 800 ppm, 500 ppm, 300 ppm dan 50 ppm

Pada setiap tiap botol ukuran 10 mL dimasukkan 10 ekor larva udang alam 5 ml air laut, dengan variasi konsentrasi minyak atsiri 50, 300, 500, 800, 1000, dan 2000  $\mu$ g/ml. Sebagai kontrol (negatif) digunakan

larva udang dengan 5 ml air laut. Plat di inkubasi pada suhu kamar selama 24 jam. Dihitung jumlah larva udang yang mati (tidak menunjukkan gerakan) atau hidup (terus bergerak). Setiap perlakuan dilakukan sebanyak 3 kali ulangan. LC<sub>50</sub> di tentukan dengan membuat kurva hubungan antara % kematian larva dan log konsentrasi ekstrak. Apabila pada kontrol ada larva yang mati maka % kematian larva udang ditentukan dengan rumus Abbot (Meyer *et al.* 1982).

$$\% \text{ kematian larva} = \frac{T-K}{S} \times 100\%$$

Keterangan :

T : jumlah larva uji yang mati

K : jumlah larva kontrol yang mati

S : jumlah larva uji

### 3. Uji analisis GC-MS

Identifikasi Uji minyak atsiri menggunakan alat kromatografi gas yang digabung dengan spektrometer massa (GC-MS). Uji ini dilakukan di Pusat Laboratorium Forensik MABES POLRI. Instrumen GCMSD 5973 menggunakan

kolom kapiler Agilent 19091S-433, dengan kondisi laju alir 0.6 $\mu$ l/menit, gas pembawa Helium, suhu injektor 250°C, suhu interface 280°C. Kondisi spektrometer massanya adalah energi ionisasi 70eV, metode ionisasinya adalah *Electron Impact*

## HASIL PENELITIAN

### Hasil Uji Aktivitas Toksisitas Minyak Atsiri

Uji Aktivitas toksisitas minyak atsiri dilakukan dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Letality Test*). Uji toksisitas dilakukan dengan menghitung persen mortalitas (kematian) larva *Artemia salina* pada variasi konsentrasi 50 ppm, 300 ppm, 500 ppm, 800 ppm, 1000 ppm dan 2000 ppm, dengan 3 kali pengulangan lalu dibandingkan dengan kontrol dan dilakukan analisis hasil sehingga diperoleh nilai LC<sub>50</sub>. Hasil uji BSLT minyak atsiri kemangi, rimpang lengkuas dan sirih merah disajikan pada Tabel berikut.

Tabel 1  
Hasil uji toksisitas minyak atsiri daun kemangi

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi	Jumlah larva yang hidup			% kematian
		1	2	3	
2000	3,301	0	0	0	83,3
1000	3,00	0	0	0	83,3
800	2,903	0	0	0	83,3
500	2,699	1	0	1	76,6
300	2,477	2	3	2	60
50	1,699	4	3	3	50

Tingkat toksisitas minyak atsiri ditunjukkan dengan nilai LC<sub>50</sub> yang menyatakan konsentrasi suatu zat yang menyebabkan 50% kematian hewan uji. Nilai LC<sub>50</sub> diperoleh dari analisis probit

menggunakan Microsoft Excel dengan persamaan  $y=0,693877x + 3,780527$ , diperoleh Nilai LC<sub>50</sub> minyak atsiri daun kemangi adalah 57,21 ppm.

Tabel 2  
Hasil uji toksisitas minyak atsiri rimpang lengkuas

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi	Jumlah larva yang hidup			% kematian
		1	2	3	
2000	3,301	0	0	0	83,3
1000	3,00	1	1	1	73,3
800	2,903	2	1	1	70
500	2,699	3	2	1	63,3
300	2,477	4	2	3	53,3
50	1,699	5	4	2	46,6

Berdasarkan analisis probit diperoleh persamaan  $y = 0,6292x + 3,7155$  dengan

nilai  $LC_{50}$  minyak atsiri rimpang lengkuas sebesar 110,01 ppm.

Tabel 3  
Hasil uji toksitas minyak atsiri daun sirih merah

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi	Jumlah larva yang hidup			% kematian
		1	2	3	
2000	3,301	0	0	0	83,3
1000	3,00	3	1	2	63,3
800	2,903	2	2	3	60
500	2,699	3	4	3	50
300	2,477	4	5	4	40
50	1,699	4	5	6	26,6

Berdasarkan analisis probit diperoleh persamaan  $y = 0,9085x + 2,6772$  dengan nilai  $LC_{50}$  minyak atsiri daun sirih merah sebesar 360,51 ppm.

#### Hasil Analisis GC MS minyak atsiri

Identifikasi kandungan senyawa-senyawa yang terdapat dalam distilat kasar, minyak kemangi, lengkuas, dan sirih merah dilakukan dengan instrumen GC-MS. Perbedaan senyawa-senyawa utama yang terkandung dalam ekstrak minyak atsiri disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4  
Identifikasi komponen - komponen utama ekstrak minyak atsiri menggunakan uji GC-MS.

Minyak atsiri	Nama senyawa	Rendemen (%)
Atsiri	6-metil-5-hepten-2-on	1.25
	linalool	5.08
	Terpineol	1.13
	Cis-geraniol	2.34
	Beta-citral	28.43
	Geraniol	2.07
	lemonal	37.9
	Eugenol	1.44
	sikloheksil format	1.26
	Beta.-kariofilena	3.39
Kemangi	1,3-sikloheksadiena	1.50
	Trans-beta-farnesen	1.12
	Alpha.-humulena	1.38
	Germacrene D	1.39
	Cis-.alpha.-bisabolena	5.12
	Beta-pinena	3.21
	1,8-cineol	17.97
	Phenol, 4-(2-propenil)	6.58
	Beta-Elemena	4.07
	Kariofillena	4.72
Lengkuas	Trans-beta-farnesen	12.46
	Germacrene D	10.35
	Germacrene B	1.43
	Beta-bisabolene	1.23
	2,6-dimetilfenil borat	20.26
	8-heptadekena	2.15
	Farnesol asetat	1.22
	Cis-isoeugenol	0.97
	Alpha tuhyena	2.03
	Beta pinena	1.05

Sirih Merah	Sabinena	30.51
	Beta mircena	15.22
	Alpha terpinena	1.40
	Gamma terpinena	3.21
	Alpha terpinolena	0.90
	Linalool	7.20
	4-terpineol	4.03
	Trans kariofilena	1.97
	Germakrena D	5.02
	Alpha kopaena	0.13

## PEMBAHASAN

Uji toksisitas dengan metode BSLT dengan hewan uji *A. salina* merupakan uji pendahuluan sederhana untuk mengetahui adanya aktivitas biologis dari suatu tanaman. Sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan Meyer, et al (1982) bahwa BSLT telah diterapkan sebagai salah satu teknik bioassay untuk menentukan toksisitas ekstrak tanaman, toksisitas logam berat (Martinez,et al, 1999), Toksisitas nanopartikel ( Maure Jones et al., 2013). Janakiraman dan Johnson (2016) juga menyatakan bahwa uji BSLT dapat digunakan sebagai dasar untuk uji toksisitas terhadap sel line, aktivitas anti-tumor dan anti-kanker.

Hasil uji toksisitas dinyatakan dengan *Lethal Concentration* 50 (LC50), yakni konsentrasi optimum ekstrak yang mampu membunuh 50% populasi larva *A. salina*. Nilai LC50 yang semakin rendah menunjukkan efek toksisitas yang semakin tinggi. Menurut Meyer et al.,(1982), suatu senyawa dapat dikatakan memiliki bioaktivitas jika dalam uji toksisitas nilai  $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ . Berdasarkan data penelitian ini toksisitas minyak atsiri kemanggi, lengkuas dan sirih merah berturut-turut adalah 57,21 ppm, 110,01 ppm, dan 360,51 ppm, yang dapat disimpulkan sementara bahwa ketiga sampel minyak atsiri tersebut memiliki bioaktivitas dan bersifat toksik. Dengan aktivitas ketoksikan tertinggi pada minyak atsiri kemanggi dengan  $LC_{50}$  sebesar 57,21 ppm dan aktivitas ketoksikan terendah adalah minyak atsiri sirih merah dengan  $LC_{50}$  sebesar 360,51 ppm. Suatu ekstrak dikatakan tidak toksik jika  $LC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ , toksik rendah jika  $LC_{50}$  bernilai 500-1000  $\mu\text{g/mL}$ , toksik sedang jika  $LC_{50}$  100-500  $\mu\text{g/mL}$ , dan toksik tinggi jika  $LC_{50}$  0-100

$\mu\text{g/mL}$  (Hamidi, Jovanova, dan Panovska, 2014). Dengan demikian dapat dikatakan minyak atsiri kemanggi berada pada kriteria toksik tinggi,sedangkan minyak atsiri lengkuas dan sirih merah berada pada kriteria sedang. Kematian larva diduga karena adanya potensi golongan senyawa yang terdapat dalam minyak atsiri yaitu golongan monoterpen, monoterpena, sesquiterpen dan senyawa turunannya yang bersifat toksik, menurut Dirgantara S et al (2018) mekanisme kematian larva pada uji toksisitas diduga karena potensi golongan senyawa yang terdapat di dalam ekstrak yang dapat menghambat daya makan larva (*antifeedant/ pengelak makan*) dengan bertindak sebagai *stomach poisoning* atau racun perut (Dirgantara S, et al (2018)). Nilai LC50 yang berbeda pada setiap minyak atsiri tanaman dapat disebabkan oleh perbedaan jenis dan kandungan senyawa monoterpen, sesquiterpen dan senyawa turunannya. perbedaan kandungan senyawa kimia pada masing-masing minyak atsiri dapat dilihat pada data GCMS Tabel 4.

Berdasarkan analisis data GC-MS pada Tabel 4, minyak atsiri kemanggi mengandung komponen senyawa kimia golongan monoterpen, monoterpen alkohol, monoterpen aldehid, ester dan sesquitepen dengan komponen yang memiliki kadar paling tinggi diatas 5% yaitu beta sitral (28,43 %),lemonal (37.9%) yang keduanya merupakan senyawa kimia golongan monoterpen aldehid dan Cis-alpha-bisabolena (5.12%) golongan sesquiterpen. Pada minyak atsiri lengkuas mengandung komponen senyawa kimia golongan monoterpen,monoterpen alkohol, sesquiterpen, dan ester, komponen utama penyusun minyak atsiri dengan kadar tertinggi adalah 1,8-cineol (17.97%), Trans-beta-farnesen (12,46%) dan Germacrene D

(10.35%) yang merupakan golongan sesquiterpen. Minyak atsiri sirih merah mengandung komponen senyawa kimia golongan monoterpen, monoterpen alkohol dan sesquiterpen, dengan komponen utama penyusun minyak atsirinya adalah Sabinena (36.64%), Beta mircena (11,22%) yang merupakan golongan sesquiterpen dan Linalool (8.27%) golongan monoterpen alkohol. LC<sub>50</sub> minyak atsiri kemanggi paling rendah dibandingkan minyak atsiri lainnya, hal ini bisa disebabkan pada minyak atsiri kemanggi mengandung beta sitral dan lemonal yang merupakan golongan monoterpen aldehid dan senyawa dominan penyusun minyak atsiri kemanggi.

## SIMPULAN

Hasil uji *Brine Shrimp Lethality Test* menunjukkan bahwa minyak atsiri daun kemanggi, rimpang lengkuas, dan sirih merah memiliki tingkat toksitas dengan LC<sub>50</sub> secara berturut-turut adalah 57,21 ppm, 110,01 ppm, 360,51 ppm yang bersifat toksik. Berdasarkan hasil analisis GC-MS komponen utama senyawa penyusun minyak atsiri daun kemanggi adalah lemonal dan beta citral, komponen utama minyak atsiri rimpang lengkuas adalah 2,6-dimetilfenil borat, 1,8-cineol, sedangkan komponen utama senyawa penyusun minyak atsiri sirih merah adalah sabinena dan beta mircena.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Burt, S. 2007. Antibacterial activity of essential oils: potential application in food. Ph.D. thesis. Institute for Risk Assesment Sciences, Division of Veterinary Medicine, Public Health. Utrecht University.
2. Chapman RF dan Boer GD, 1995. *Regulatory Mechanism in Insect Feeding*. New york :Chapman & Hall.
3. Dirgantara S, RHR. Tanjung , H K. Maury , E Meiyanto.2018. Cytotoxic Activity and Phytochemical Analysis of Breynia cernua from Papua. Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology 1(1) ; 31-36.
4. Dubey, N. K., R. Shukla, A. Kumar, P. Singh, and B. Prakash.2010. Prospects of botanical pesticides in sustainable agricult ure. Current Science 4(25):479-480.
5. Hartati, S. Y. 2012. Prospek Pengembangan Minyak Atsiri sebagai Pestisida Nabati. Perspektif 11(1) : 45-58.
6. Hamidi, M., Jovanova, B., & Panovska, T. (2014). Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina L.*) model. Macedonian Pharmaceutical Bulletin, 60(1), 9-18.
7. Isman, M. B. 2000. Plant essential oils for pest and disease management. Crop Protection. 19: 603-608
8. Janakiraman, N., & Johnson, M. (2016). Ethanol extracts of selected cyathea species decreased cell viability and inhibited growth in MCF 7 cell line cultures. Journal of Acupuncture and Meridian Studies, 9(3), 151–155.
9. Koul, O., S. Walia, and G. S. Dhaliwal. 2008. Essential oils as green pesticides: Potential and constrains. Biopesticides. Int. 4 (1): 63-84.
10. Lenny, S. 2006. Senyawa Terpenoida dan Steroida.Karya Ilmiah.Medan : Universitas Sumatera Utara.
11. Martínez, M., Del Ramo, J., Torreblanca, A., Díaz-Mayans, J., 1999. Effect of cadmium exposure on zinc levels in the brine shrimp *Artemia parthenogenetica*. Aquaculture. 172, 315- 325.
12. Maurer-Jones, M.A., Love, S.A., Meierhofer, S., Marquis, B.J., Liu, Z., Haynes, C.L., 2013. Toxicity of nanoparticles to brine shrimp: An introduction to nanotoxicity and interdisciplinary science. J Chem Edu. 90, 475-478.
13. 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.
14. Rajkumar, S. and A. Jebanesan. 2007. Repellent activity of selected plant essential oils against the malarial fever mosquito *Anopheles stephensi*. Tropical Biomedicine 24 (2): 71-75.
15. Veni, T., & Pushpanathan, T. (2014). Comparison of the *Artemia* toxicity of I

- ndian medicinal salina and Artemia fransiscana bioassays for plants. Journal of Coastal Life Medicine, 2(6), 453-457.
16. Zuraida.2019. Analisis toksisitas beberapa tumbuhan hutan dengan metode brine shrimp lethality test (bslt). Jurnal Penelitian Hasil Hutan Vol. 36 No. 3 : 239-246