

Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Kulit Batang Pala (*Myristica fragrans* Houtt) Terhadap *Artemia salina* Leach

Anggun Gazali¹, Aulia Wati¹, Virsa Handayani^{*1}
¹Universitas Muslim Indonesia, Makassar, Sulawesi Selatan

*Email: virsa.handayani@umi.ac.id

ABSTRACT

Nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt) is a multipurpose plant that comes from the Myristicaceae family and has properties to treat indigestion, diarrhea, plague parasites and rheumatism. Nutmeg bark contains secondary metabolite compounds of alkaloids, flavonoids, triterpenoids, saponins, and tannins. This study aims to determine the toxicity effect and *Lethal Concentration* (LC₅₀) value of ethanol extract of nutmeg stem bark (*Myristica fragrans* Houtt) on *Artemia salina* Leach larvae. The extraction method used was reflux using ethanol 96% solvent. The ethanol extract of Nutmeg bark (*Myristica fragrans* Houtt) was made with a concentration series of 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 1500 ppm and toxicity test was carried out using *Artemia salina* Leach larvae, then calculated the percent mortality of larvae using Probit analysis. The test results showed that ethanol extract of Nutmeg bark (*Myristica fragrans* Houtt) at concentration of 1500 ppm caused the highest larval mortality with a total of 29 larval deaths. Based on the results of the research, it can be concluded that the ethanol extract of nutmeg bark (*Myristica fragrans* Houtt) has a toxic effect on *Artemia salina* Leach larvae and the *Lethal concentration* (LC₅₀) value of the ethanol extract of nutmeg bark (*Myristica fragrans* Houtt) is 226.986 µg/mL so it is in the toxic category.

Keywords: Toxicity, Nutmeg bark (*Myristica fragrans* Houtt), *Artemia salina* Leach.

ABSTRAK

Tanaman pala (*Myristica fragrans* Houtt) merupakan tanaman multiguna yang berasal dari family *Myristicaceae* dan memiliki khasiat untuk mengobati gangguan pencernaan, diare, parasit wabah dan rematik. Kulit batang pala mengandung senyawa metabolit sekunder alkaloid, flavonoid, triterpenoid, saponin, dan tanin. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan efek toksik dan nilai *Lethal Concentration* 50% (LC₅₀) ekstrak etanol kulit batang pala (*Myristica fragrans* Houtt) terhadap larva *Artemia salina* Leach. Metode ekstraksi yang digunakan adalah refluks dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Ekstrak etanol kulit batang pala (*Myristica fragrans* Houtt) dibuat larutan uji dengan seri konsentrasi 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 1500 ppm dan dilakukan pengujian toksisitas dengan menggunakan larva *Artemia salina* Leach, kemudian dihitung persen kematian larva menggunakan analisis probit. Hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstrak etanol kulit batang pala (*Myristica fragrans* Houtt) pada konsentrasi 1500 ppm menyebabkan kematian larva tertinggi dengan total kematian larva sebanyak 29 ekor. Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol kulit batang pala (*Myristica fragrans* Houtt) memberikan efek toksik terhadap larva *Artemia salina* Leach dan nilai *Lethal concentration* (LC₅₀) pada ekstrak etanol kulit batang pala (*Myristica fragrans* Houtt) yaitu 226,986 µg/mL sehingga masuk kategori toksik

Kata Kunci : Toksisitas; Kulit batang pala (*Myristica fragrans* Houtt); *Artemia salina* Leach.

PENDAHULUAN

Tanaman pala dikenal sebagai rempah yang memiliki nilai ekonomi dan multiguna. Seluruh bagian tanaman pala memiliki banyak manfaat untuk manusia, sehingga telah banyak dimanfaatkan dalam berbagai industri [1]. Kulit batang pala merupakan salah satu bagian dari tanaman pala yang belum banyak dimanfaatkan. Secara empiris masyarakat menggunakan kulit batang pala untuk mengobati gangguan pencernaan, diare, parasit, wabah dan rematik. Kulit batang pala berpotensi sebagai antioksidan, antibakteri, antijamur, antiinflamasi, antiulserogenik, dan antikanker [2].

Uji toksisitas merupakan uji untuk mengamati aktivitas farmakologi suatu senyawa yang terjadi dalam waktu singkat. Salah satu metode yang digunakan untuk mengamati toksisitas senyawa dan merupakan metode penapisan untuk aktivitas antikanker senyawa kimia dalam ekstrak tanaman adalah *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) [3]. BSLT merupakan metode yang banyak digunakan untuk skrining awal senyawa antikanker baru yang berasal dari tanaman [4]

Telah dilakukan penelitian terkait kulit batang pala yang membuktikan bahwa ekstrak metanol kulit batang pala mengandung senyawa metabolit sekunder golongan alkaloid, terpenoid, fenolik dan flavonoid [5]. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan [6] membuktikan ekstrak daun pala memberikan efek toksik terhadap larva *Artemia salina* Leach dengan nilai LC_{50} sebesar 74,098 ppm. Oleh karena itu penelitian terkait uji toksisitas perlu dilakukan pada bagian lain tanaman pala yaitu kulit batang, untuk melihat toksisitas yang terdapat pada kulit batang tanaman pala.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari seperangkat alat gelas, sendok tanduk, mikropipet dan tip, seperangkat alat refluks, seperangkat alat rotavapor, seperangkat alat penetasan telur larva, timbangan analitik, vial, alat penerang (lampu pijar), aerator.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah air laut, kulit batang pala, etanol 96%, ekstrak ragi, larva (*Artemia salina* Leach), HCl 2N, Pereaksi Bauchardat, pereaksi Mayer, pereaksi Wagner, serbuk Mg 0,1 g, HCl pekat, asetat anhidrat, H₂SO₄, aquadest, FeCl₃, kertas whatman No. 42, alumunium foil.

Prosedur Kerja

Penyiapan dan Pengolahan Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah kulit batang pala yang diperoleh dari Kota Sofifi Kabupaten Halmahera Utara. Kemudian, sampel disortasi dan dipotong kecil-kecil lalu dikeringkan, setelah itu sampel dihaluskan menjadi serbuk kasar. Selanjutnya sampel diekstraksi menggunakan metode refluks.

Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak etanol kulit batang pala dilakukan dengan cara ditimbang sebanyak 200 gram kulit batang pala kemudian dimasukkan ke dalam labu alas bulat bersama dengan pelarut etanol 96% sebanyak 800 mL. selanjutnya sampel dipanaskan menggunakan alat refluks selama 6 jam. Hasil

penguapan dari cairan ekstraksi akan terkondensasi pada kondensor menjadi molekul-molekul cairan yang akan turun kembali ke dalam labu alat bulat. Setelah selesai kemudian disaring dan dipekatkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* hingga menjadi ekstrak kental [7].

Uji Skrining Fitokimia

Uji Alkaloid. Ekstrak etanol kulit batang pala sebanyak 2 mL dimasukkan kedalam tabung reaksi lalu diencerkan dengan etanol 96%. Kemudian ditambahkan 5 tetes HCl 2N, lalu dipanaskan dan disaring. Selanjutnya dipipet 1 mL filtrat dan dimasukkan kedalam tabung reaksi masing-masing tabung reaksi ditambahkan dengan pereaksi Bauchardat, pereaksi Mayer, dan pereaksi Wagner. Hasil positif alkaloid pada pereaksi Mayer terbentuk endapan berwarna putih, pereaksi Bauchardat terbentuk endapan berwarna coklat, dan pereaksi Wagner terbentuk endapan berwarna coklat [8].

Uji Flavonoid. Ekstrak etanol kulit batang pala sebanyak 2 mL dicampur dengan 3 mL etanol 96%, lalu dikocok dan dipanaskan, kemudian dikocok lagi setelah itu disaring. Filtrat yang diperoleh, kemudian ditambahkan serbuk Mg 0,1 g dan 2 tetes HCl pekat. Hasil positif flavonoid terbentuk warna orange merah atau kuning [8].

Uji Steroid/Triterpenoid. Ekstrak etanol kulit batang pala sebanyak 2 mL ditambahkan dengan 1 mL etanol 96% lalu dikocok. Selanjutnya, ditambahkan 2 tetes asetat anhidrat dan 2 tetes H₂SO₄ kedalam filtrat. Hasil positif steroid menghasilkan warna biru atau hijau, sedangkan positif triterpenoid menghasilkan warna merah atau ungu [8].

Uji Saponin. Ekstrak etanol kulit batang pala sebanyak 2 mL di didihkan menggunakan 10 mL air dalam penangas air. Filtrat kemudian dikocok dan didiamkan. Hasil positif mengandung saponin terbentuk buih setinggi 1 cm selama tidak kurang dari 10 menit dan pada penambahan 1 tetes HCl 2N buih tidak hilang [8].

Uji Tanin. Ekstrak etanol kulit batang pala sebanyak 2 mL ditambahkan dengan beberapa tetes (2-3 tetes) FeCl₃. Hasil positif tannin pirogalol berwarna hijau kehitaman dan tannin katekol berwarna hijau [8].

Pengujian dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)

Penyiapan Larva. Telur *Artemia salina* Leach ditimbang sebanyak ±50 mg kemudian dimasukkan kedalam bejana penetas yang diberi sekat sehingga memiliki dua sisi ruang yaitu sisi terbuka dan tertutup (gelap). Bejana penetas lalu diisi dengan air laut yang telah disaring dengan kertas whatman No. 42, kemudian dimasukkan aerator dan disinari dengan lampu pijar. Setelah 24 jam, telur yang telah menetas menjadi nauplii dipindahkan ke tempat lain, dan 24 jam kemudian nauplii tersebut diberikan suspensi ragi sebagai bahan makanan dan bisa langsung digunakan sebagai hewan uji [7].

Pembuatan Larutan Uji. Larutan stok yang digunakan dibuat dengan cara ditimbang 400 mg ekstrak etanol kulit batang pala yang dilarutkan dalam 2 mL air laut. Jika sampel tidak larut atau sukar larut, maka ditambahkan dimetil sulfoxida (DMSO) 1% sebanyak 0,1-50 µg atau 2 tetes, kemudian ditambahkan air laut hingga volumenya mencapai 100 mL sehingga didapatkan konsentrasi larutan stok 4000

ppm. Larutan uji ekstrak etanol kulit batang pala dibuat dari larutan stok dalam konsentrasi 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, dan 1500 ppm [7].

Pengujian Toksisitas. Uji toksisitas dilakukan pada masing-masing kelompok ekstrak sampel yang dibagi menjadi 5 kelompok uji, yaitu 4 kelompok perlakuan (250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, dan 1500 ppm) dan 1 kelompok kontrol atau pembandingan (air laut). Setiap pengujian dilakukan 3 kali pengulangan. Selanjutnya pada tiap konsentrasi larutan dimasukkan 10 ekor larva *Artemia salina* Leach ke dalam vial. Kontrol dimasukkan 5 mL air laut tanpa larutan uji. Kemudian, pengamatan dilakukan selama 24 jam terhadap kematian larva *Artemia salina* Leach lalu dihitung jumlah larva yang mati dari tiap vial kemudian dilanjutkan dengan analisa probit untuk menentukan nilai LC_{50} [7].

Analisis Data

Uji toksisitas sampel ditentukan dengan melihat besarnya nilai dari LC_{50} yang dapat mematikan larva udang *Artemia salina* Leach sampai 50% dan dilakukan perhitungan dengan analisis probit (*probability unit*), efek toksisitas dapat di analisis dari persen kematian [9].

HASIL DAN DISKUSI

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit batang pala (*Myristica fragrans* Houtt) yang diperoleh dari Sofifi, Maluku Utara. Sampel kulit batang pala yang telah kering kemudian diserbukkan dan diayak menggunakan ayakan nomor mesh 20. Tujuan dilakukan pengeringan pada sampel adalah agar meminimalkan kadar air yang dapat digunakan sebagai media tumbuh mikroorganisme sehingga menyebabkan penurunan kualitas senyawa aktif yang terkandung didalam sampel [10]

Simplisia kulit batang pala (*Myristica fragrans* Houtt) diekstraksi menggunakan metode refluks dengan menggunakan pelarut 96%. Etanol 96% dipilih karena berdasarkan hasil penelitian [11] etanol merupakan pelarut yang mudah didapatkan, efisien, aman untuk lingkungan, dan memiliki tingkat ekstraksi tinggi sehingga dapat menarik senyawa yang bersifat polar maupun nonpolar. Hasil dari refluks kemudian disaring dan diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental kemudian dihitung persen rendemennya. Nilai persen rendemen dari ekstrak etanol kulit batang pala sebesar 8,265% dari berat ekstrak yang diperoleh sebesar 16,53gram dan berat sampel yang diekstraksi sebanyak 200 gram. (Tabel 1).

Uji fitokimia adalah uji pendahuluan yang dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak kulit batang pala [12]. Hasil uji fitokimia ekstrak etanol kulit batang pala menunjukkan bahwa kulit batang pala positif mengandung senyawa metabolit sekunder alkaloid, flavonoid, triterpenoid, saponin dan tannin (Tabel 2).

Ekstrak etanol kulit batang pala selanjutnya dilakukan pengujian dengan menggunakan metode BSLT sebagai uji pendahuluan/ praskrining aktivitas biologis yang sederhana untuk menentukan toksisitas suatu senyawa atau ekstrak. Salah satu organisme yang sangat sesuai sebagai hewan uji untuk mengetahui bioaktivitas senyawa melalui uji toksisitas adalah *brine shrimp* (udang laut) dari jenis *Artemia salina* Leach karena pertumbuhan dari larva *Artemia salina* Leach sangat mirip dengan sel kanker [13] Berdasarkan morfologi dari larva *Artemia salina* Leach yang digunakan, larva *Artemia salina* Leach yang berusia 48 jam

sudah mulai mempunyai mulut dan saluran pencernaan untuk mengonsumsi makanan [14]

Hasil pengamatan uji toksisitas ekstrak etanol kulit batang pala menunjukkan bahwa semua kelompok seri konsentrasi menyebabkan kematian pada larva kecuali kelompok kontrol, hal ini dapat disebabkan karena air laut merupakan habitat dari larva *Artemia salina* Leach (Tabel 3). *Lethal concentration 50* (LC₅₀) merupakan konsentrasi zat yang menyebabkan terjadinya kematian pada 50% hewan percobaan yaitu larva *Artemia salina* Leach [13]. Dari grafik menunjukkan log konsentrasi terhadap nilai probit yang diperoleh dari presentase kematian larva adalah 226,986 µg/ml. Suatu ekstrak menunjukkan aktivitas toksik dalam uji toksisitas jika nilai LC₅₀ < 1000 µg/ml sehingga berdasarkan pernyataan tersebut maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak kulit batang pala bersifat toksik. Mekanisme kematian larva *Artemia salina* Leach berhubungan erat dengan fungsi senyawa flavonoid, alkaloid, dan saponin yang terkandung dalam ekstrak kulit batang pala, karena senyawa tersebut dapat menghambat daya makan larva. Cara kerja senyawa metabolit sekunder flavonoid adalah dengan bertindak sebagai *stomach poisoning* (racun perut) sehingga dapat menghambat daya makan larva. Senyawa alkaloid bekerja disaraf dan dapat menyebabkan gangguan pencernaan, hal ini mengakibatkan larva gagal mendapatkan stimulus rasa sehingga tidak mengenali suspensi ragi sebagai makanan dan akan mati kelaparan. Senyawa saponin akan mengikat oksigen dalam air sehingga kadar oksigen didalam air menurun dan mengakibatkan kematian pada larva *Artemia salina* Leach [12].

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Ekstrak etanol kulit batang pala (*Myristica fragrans* Houtt) dapat memberikan efek toksik terhadap larva *Artemia salina* Leach.
2. Nilai *Lethal Concentration 50* (LC₅₀) pada ekstrak etanol kulit batang pala (*Myristica fragrans* Houtt) yaitu 226,986 µg/mL dan masuk kategori toksik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada dosen Pembimbing penelitian yang telah mencurahkan pikiran hingga selesainya penelitian ini. Serta ucapan terima kasih kepada Lab Farmakognosi-Fitokimia Universitas Muslim Indonesia yang telah memberikan izin penelitian dan turut membantu selama peneliti melakukan penelitian hingga selesai.

REFERENSI

- [1]. Ginting B, Mustanir M, Helwati H, Desiyana LS, Eralisa E, Mujahid R. Antioxidant Activity of n-Hexane Extract of Nutmeg Plants From South Aceh Province. *J Nat.* 2017;17(1):39.
- [2]. Ashokkumar K, Vellaikumar S, Muthusamy M, Dhanya MK, Aiswarya S. Compositional variation in the leaf, mace, kernel, and seed essential oil of nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) from the Western Ghats, India. *Nat Prod Res.* 2021;36(1):432–5.
- [3]. Jelita SF, Setyowati GW, Ferdinand M, Zuhrotun A, Megantara S. Uji Toksisitas Infusa *Acalypha Simensis* Dengan Metode *Brine Shrip Lethality Test* (BSLT). *J Farmaka.* 2020;18(1):14–22.
- [4]. Chusniasih D, Tutik T. Uji Toksisitas Dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) Dan Identifikasi Komponen Fitokimia Ekstrak Aseton Kulit Buah Kakao (*Theobroma kakao* L.). *Anal Anal Environ Chem.* 2020;5(02):192–201.
- [5]. Maulana I, Ginting B, Nurdin N, Fakri S. Antioxidant Activity of Ethyl Acetate Extract of Nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt) Stem Bark. *J Nat.* 2019;19(3):58–63.
- [6]. Susanty, Dewi KC, Hendrawati TY, Rusanti WD, Sari F. Determination of Used Cooking Oil ' s Toxicity Level by Adding Nutmeg Leaves (*Myristica fragrans* Houtt) Extract. *J Int Conf Eng Constr Renew Energy, Adv Mater.* 2021;(November):1–6.
- [7]. Handayani V, Rahman S, Amaliah ANA. Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Batang Kayu Wole Woe Terhadap Larva *Artemia salina* Leach Menggunakan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). *As-Syifaa J Farm.* 2022;14(2):131–8.
- [8]. Harbone, J. B. *Metode Fitokimia Edisi Kedua.* Bandung: 2019.
- [9]. Saragih DS, Ridwanto, Daulay AS, Haris Munandar Nasution, Miswanda D. Toxicity Test of Windu Shrimp (*Penaeus monodon*) Skin Chitosan With *Brine Shrimp Lethality Test* Method. *Indones J Chem Sci Technol.* 2022;4(2):88–93.
- [10]. Anggraini DI, Nabillah LF. Activity Test of Suji Leaf Extract (*Dracaena angustifolia* Roxb.) on in vitro cholesterol lowering. *J Kim Sains dan Apl.* 2018;21(2):54–8.
- [11]. Hakim AR, Saputri R. Narrative Review: Optimasi Etanol sebagai Pelarut Senyawa Flavonoid dan Fenolik. *J Surya Med.* 2020;6(1):177–80.
- [12]. Khasanah NW, Karyadi B, Sundaryono A. Uji Fitokimia dan Toksisitas Ekstrak Umbi *Hydnophytum* sp. terhadap *Artemia salina* Leach. *PENDIPA J Sci Educ.* 2020;4(1):47–53.
- [13]. Kurniawan H, Ropiqa M. Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Daun Ekor Kucing (*Acalypha hispida* Burm.f.) Dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). *J Syifa Sci Clin Res.* 2021;3(2):52–62.
- [14]. Aqiila GR, Taufiqurrahman I, Wydiamala E. Uji Efektifitas Ekstrak Etanol Daun *Ramania* (*Bouea macrophylla* Griffith) Terhadap Mortalitas Larva *Artemia salina* Leach. *J Kedokt Gigi Dentino.* 2017;2(2):170–6.

TABEL

Tabel 1. Hasil rendemen ekstrak etanol kulit batang pala (*Myristica fragrans* Houtt)

Jenis ekstrak	Bobot awal simplisia yang ditimbang (g)	Bobot ekstrak yang diperoleh (g)	Rendemen ekstrak (%)
Ekstrak etanol kulit batang pala	200	16,53	8,265

Tabel 2. Hasil uji fitokimia ekstrak etanol kulit batang pala (*Myristica fragrans* Houtt)

No	Golongan Senyawa	Hasil	Keterangan
1	Alkaloid		
	- Mayer	Endapan putih	+
	- Wagner	Endapan coklat	+
	- Bauchardat	Endapan jingga	+
2	Flavonoid	Merah	+
3	Triterpenoid	Ungu	+
4	Saponin	Buih setinggi 1 cm	+
5	Tanin	Hijau Kehitaman	+

Keterangan : (+) mengandung senyawa metabolit sekunder

(-) tidak mengandung golongan senyawa metabolit sekunder

Tabel 3. Data Hasil Pengamatan Kematian Larva *Artemia salina* L. Setelah 24 jam Pada Ekstrak Etanol Kulit Batang Pala (*Myristica fragrans* Houtt) dengan Metode BSLT

Sampel Uji	Replikasi	Jumlah Larva Udang yang Mati Tiap Konsentrasi (ppm) Larutan Uji				
		250	500	1000	1500	Kontrol
Ekstrak Etanol Kulit Batang Pala	1	6	8	9	10	0
	2	5	7	9	9	0
	3	4	7	9	10	0
Total Kematian		15	22	27	29	0
%Kematian		50%	73,33%	90%	96,66%	-
Nilai Probit		5,00	5.61	6,28	6.75	-

GAMBAR

Gambar 1. Grafik data pengamatan kematian larva *Artemia salina* Leach menggunakan analisis probit.

