

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN TOKSISITAS TINGTUR  
KEMENYAN TOBA (*Styrax paralleoneurus*): STUDI *In Vitro***

**Karya Tulis Ilmiah  
untuk Memenuhi Sebagian Syarat  
Memperoleh Derajat Sarjana Kedokteran**

**Program Studi Kedokteran  
Program Sarjana**



**oleh:**

**Reza Ishak Estiko  
17711159**

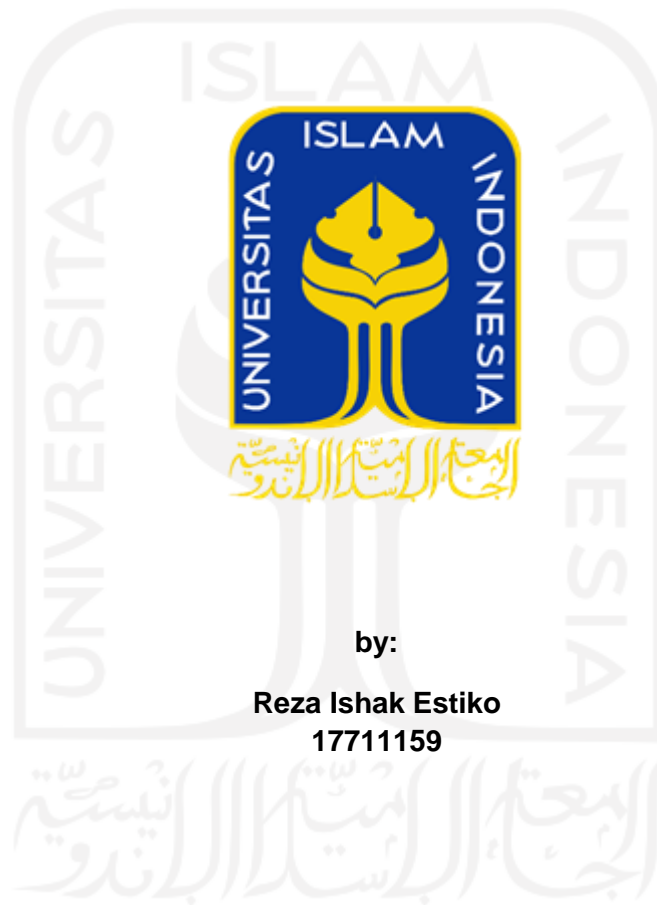
**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA  
YOGYAKARTA  
2020**

**ANTIOXIDANT AND TOXICITY ASSAY OF SUMATRA BENZOIN  
(*Styrax paralleoneurus*): IN VITRO STUDY**

**Scientific Writing**

**as A Requirement for the Degree of Undergraduate Program in Medicine**

**Undergraduate Program in Medicine**



**by:**

**Reza Ishak Estiko**

**17711159**

**FACULTY OF MEDICINE  
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA  
YOGYAKARTA  
2020**

**KARYA TULIS ILMIAH**

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN TOKSISITAS TINGTUR KEMENYAN  
TOBA (*Styrax paralleoneurus*): STUDI *In Vitro***

Disusun dan ditujukan oleh:



Reza Ishak Estiko  
17711159

Telah diseminarkan tanggal 24 Agustus 2020  
dan telah disetujui oleh:

Penguji Pembimbing

dr. Riana Rahmawati, M.Kes, Ph.D. Dr. dr. Isnatin Miladiyah, M.Kes.  
NIK 017110418 NIK 017110409

Ketua Program Studi Kedokteran  
Program Sarjana



dr. Umatul Khoiriyah, M.Med.Ed, Ph.D  
NIK 047110101

Disahkan  
Dekan



dr.  Rida Kusuma, M.Kes, Sp.PK(K)  
NIK 017110102

## PERNYATAAN PUBLIKASI

*Bismillahirrahmaanirrahiim*

Yang bertanda tangan di bawah ini, saya

Nama : Reza Ishak Estiko  
NIM : 17711159  
Judul KTI : Uji Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Tingtur  
Kemenyan Toba (*Styrax paralleoneurus*): Studi *In Vitro*  
Dosen Pembimbing : Dr. dr. Isnatin Miladiyah, M.Kes.

Dengan ini menyatakan bahwa :

**Memberi Ijin** kepada Perpustakaan FK UII mempublikasikan di repository UII, berupa : \_

- ~~Laporan KTI (full text)~~
  - Abstrak saja
- (coret yang tidak diperlukan)

Demikian pernyataan ini dibuat dengan sesungguhnya dan dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Yogyakarta, 10 Oktober 2020

Dosen Pembimbing



Dr. dr. Isnatin Miladiyah, M.Kes.  
NIK 017110409

Yang Menyatakan



Reza Ishak Estiko  
NIM 17711159

## DAFTAR ISI

Halaman Judul (Bahasa Indonesia) .....	i
Halaman Judul (Bahasa Inggris) .....	ii
Halaman Pengesahan .....	iii
Halaman Pernyataan Publikasi .....	iv
Daftar Isi .....	v
Daftar Tabel .....	vii
Daftar Gambar .....	viii
Halaman Pernyataan .....	ix
Kata Pengantar .....	x
Intisari .....	xi
<i>Abstract</i> .....	xii
Bab I. Pendahuluan .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3. Tujuan penelitian .....	3
Bab II. Tinjauan Pustaka .....	5
2.1 Tinjauan Pustaka .....	5
2.1.1 Kemenyan .....	5
2.1.2 Uji Antioksidan .....	6
2.1.3 Uji Toksisitas .....	7
2.2 Kerangka Teori .....	8
2.3 Kerangka Penelitian .....	8
2.4 Hipotesis Penelitian .....	9
Bab III. Metode Penelitian .....	10
3.1 Rancangan Penelitian .....	10
3.2 Subyek Penelitian .....	10
3.3 Waktu dan Tempat Penelitian .....	10
3.4 Variabel Penelitian .....	10
3.4.1 Variabel Terikat .....	10
3.4.2 Variabel Bebas .....	10
3.5 Definisi Operasional .....	11
3.6 Alat dan Bahan Penelitian .....	11
3.6.1 Alat Penelitian .....	11
3.6.2 Bahan Penelitian .....	12
3.7 Alur Penelitian .....	12
3.7.1 Pembuatan Tingtur Kemenyan Toba (Tahap 1) .....	12
3.7.2 Penyiapan Larutan (Tahap 2) .....	12
3.7.3 Uji Antioksidan .....	14
3.7.4 Uji Toksisitas .....	15
3.7.5 Indikator Capaian setiap Tahapan Penelitian .....	16
3.7.6 Teknik Pengumpulan Data .....	17
3.8 Analisis Data .....	17
3.9 Etika Penelitian .....	18
Bab IV. Hasil dan Pembahasan .....	19
4.1 Hasil .....	19
4.1.1 Pengumpulan Kemenyan .....	19
4.1.2 Tingtur Kemenyan Toba .....	19
4.1.3 Pengenceran Larutan .....	19
4.1.4 Uji Antioksidan .....	20
4.1.5 Uji Toksisitas .....	22
4.2 Pembahasan .....	23

4.2.1 Tingtur Kemenyan Toba .....	23
4.2.2 Uji Antioksidan .....	23
4.2.3 Uji Toksisitas.....	26
Bab V. Simpulan dan Saran.....	29
5.1 Simpulan.....	29
5.2 Saran .....	29
Daftar Pustaka.....	30
Lampiran .....	35



## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Keaslian Penelitian .....	4
Tabel 2. Persentase antioksidan.....	21
Tabel 3. Persentase kematian Nauplius.....	22



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Pohon kemenyan dan kemenyan .....	5
Gambar 2. Kerangka teori.....	8
Gambar 3. Kerangka penelitian .....	8
Gambar 4. Pembuatan larutan dengan pengenceran .....	14
Gambar 5. Alur penelitian uji antioksidan.....	15
Gambar 6. Alur penelitian uji toksisitas .....	15
Gambar 7. Tingtur kemenyan Toba .....	19
Gambar 8. Larutan hasil pengenceran.....	20
Gambar 9. Perubahan warna DPPH pada masing-masing konsentrasi .....	20
Gambar 10. Kurva hubungan % aktivitas antioksidan terhadap konsentrasi .....	21
Gambar 11. Observasi uji toksisitas.....	22
Gambar 12. Kurva mortalitas Nauplius pada tingtur kemenyan.....	23





## PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam Karya Tulis Ilmiah ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Yogyakarta, 24 Agustus 2020



Reza Ishak Estiko



## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat-nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan karya tulis ilmiah ini untuk memenuhi sebagian syarat memperoleh derajat sarjana kedokteran dari Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta.

Sholawat dan salam penulis curahkan kepada junjungan nabi Muhammad SAW yang telah membawa risalah Islam dengan ilmu pengetahuan sehingga menjadi bekal hidup di dunia maupun di akhirat kelak.

Dalam pembuatan karya tulis ilmiah ini penulis mendapat banyak hambatan dan tantangan, namun dengan dukungan dari berbagai pihak, tantangan tersebut dapat teratasi. Oleh karena itu penulis mengucapkan terimakasih kepada pihak-pihak yang telah membantu dalam penyusunan karya tulis ilmiah ini, terutama kepada yang terhormat dosen pembimbing Dr. dr. Isnatin Miladiyah, M.Kes. yang selalu membimbing penulis dalam menyusun karya tulis ilmiah ini. Penulis juga mengucapkan terimakasih kepada orang tua penulis Estiko Rijanto dan Lendrani Juwana yang terus mendukung penulis dengan kasih sayang. Tidak lupa penulis juga berterimakasih kepada kakek penulis Suparjono yang menjadi sumber inspirasi dari penyusunan karya tulis ilmiah ini. Tidak ada yang dapat penulis berikan kepada mereka selain iringan do'a yang tulus dan ikhlas semoga amal baik mereka diterima dan mendapat balasan yang lebih baik dari Allah SWT. Tidak lupa saran dan kritik yang konstruktif sangat penulis harapkan dari pembaca demi kesempurnaan laporan penelitian ini.

Akhir kata penulis berharap semoga karya tulis ilmiah ini bermanfaat bagi penulis khususnya dan pembaca pada umumnya.

Yogyakarta, 30 Juli 2020

Reza Ishak Estiko

# UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN TOKSISITAS TINGTUR KEMENYAN TOBA (*STYRAX PARALLEONEURUS*): STUDI *IN VITRO*

Reza Ishak Estiko<sup>1</sup>, Isnatin Miladiyah<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mahasiswa Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Indonesia

<sup>2</sup>Departemen Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Indonesia

## INTISARI

**Latar belakang:** pemanfaatan getah dari pohon kemenyan Toba (*Styrax paralleoneurus*) di Indonesia masih minim dan penggunaannya dalam bidang kesehatan juga terbatas. Padahal, kemenyan Toba memiliki aktivitas farmakologis yang bermanfaat dan tidak menimbulkan efek toksik. Penggunaan antioksidan sintetik sering digunakan, jika berlebihan dapat memberikan dampak negatif. Penelitian sebelumnya menggunakan metanol sebagai pelarut untuk menguji aktivitas farmakologis padahal pelarut ini bersifat keras terhadap kulit.

**Tujuan penelitian:** tujuan penelitian ini adalah mengetahui aktivitas antioksidan tingtur kemenyan Toba yang dilarutkan dalam etanol dan mengetahui kadar toksiknya.

**Metode:** metode yang digunakan berupa uji *in vitro*; uji antioksidan dan toksisitas. Pada uji antioksidan digunakan metode *2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate* (DPPH) dengan kontrol positif vitamin C dan uji toksisitasnya menggunakan *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) atau Nauplius. Analisis uji antioksidan menggunakan regresi linear setelah menghitung persentase antioksidan dan toksisitas menggunakan analisis probit setelah menghitung persentase kematian Nauplius.

**Hasil:** pada uji antioksidan menunjukkan aktivitas antioksidan yang sangat lemah dengan *the half-maximal inhibitory concentration* ( $IC_{50}$ ) sebesar 33,7 g/L. Pada uji toksisitas didapatkan *the half-maximal lethal dose* ( $LD_{50}$ ) sebesar 8,006 g/L yang dikatakan sebagai zat tidak toksik.

**Kesimpulan:** berdasarkan hasil uji *in vitro* yang telah diperoleh menunjukkan toksisitas kemenyan rendah namun aktivitas antioksidannya sangat lemah, sehingga penelitian lanjutan diperlukan untuk mengkonfirmasi hasil penelitian.

**Kata kunci:** kemenyan, antioksidan, DPPH, toksisitas, BSLT.

## ANTIOXIDANT AND TOXICITY ASSAY OF SUMATRA BENZOIN (STYRAX PARALLEONEURUS): IN VITRO STUDY

Reza Ishak Estiko <sup>1</sup>, Isnatin Miladiyah <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Medical Student, Faculty of Medicine, Universitas Islam Indonesia

<sup>2</sup> Departement of Phramacology, Faculty of Medicine, Universitas Islam Indonesia

### ABSTRACT

**Background:** the use of Sumatra benzoin (*Styrax paralleoneurus*) resin in Indonesia is minimal, also limited in health sector. Sumatra benzoin in methanol has a pharmacological activity. Frequently used of synthetic antioxidants has a negative impact. Methanol which is used widely as solvent cause irritation.

**Objectives:** the purpose of this study is to determine the antioxidant activity of Sumatra benzoin ethanol tincture is, also to know its toxicity.

**Methods:** the method used in this study was an *in vitro* assay. The antioxidant assay used the 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate (DPPH) method with vitamin C as the positive control and the toxicity test used the Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). The antioxidant assay analysis used linear regression after calculating the percentage of antioxidants. The toxicity assay used probit analysis after calculating the percentage of Nauplius deaths.

**Results:** it showed a very weak antioxidant activity with the value of the half-maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) 33,7 g/L. The value of the half-maximal lethal dose ( $LD_{50}$ ) is 8.006 g/L, interpreted as a non-toxic substance.

**Conclusions:** based on the *in vitro* test it shows that the toxicity of Sumatra benzoin is low, but its antioxidant activity is very weak, so further research is needed to confirm the research results.

**Keywords:** benzoin, antioxidants, DPPH, toxicity, BSLT.

## BAB I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Indonesia adalah negara tropis dengan berbagai macam kekayaan alam, salah satu sumber daya alam khas Indonesia adalah kemenyan Toba atau kemenyan Sumatra (*Styrax paralleoneurus*). Kemenyan Toba memiliki kualitas getah paling baik dibandingkan kemenyan jenis lain yang juga dibudidayakan di Indonesia dan memiliki nilai ekonomis seperti Kemenyan Durame, Siam, dan Bulu (Noni, 2017). Provinsi Sumatera Utara merupakan daerah penghasil kemenyan terbesar di Indonesia (Jayusman, 2014). Menurut data Badan Pusat Statistik Sumatera Utara, terdapat kebun kemenyan seluas 16.460 Ha yang terletak di Kabupaten Tapanuli Utara (BPS Sumatera Utara, 2010).

Studi terdahulu menunjukkan bahwa kemenyan Toba memiliki aktivitas farmakologis yang bermanfaat seperti antioksidan, antiinflamasi, penyembuhan luka, dan antiseptik (Hidayat *et al.*, 2018; Lusiana, 2019). Konsumsi antioksidan dengan jumlah yang cukup dapat menurunkan penyakit degeneratif dan meningkatkan imunitas. Selama ini penggunaan antioksidan sintetik sering digunakan, padahal dapat memberikan dampak negatif seperti gangguan fungsi hati, paru, mukosa usus, dan keracunan. Di lain pihak, tanaman memiliki senyawa fitokimia yang memiliki efek antioksidan alami. Oleh karena itu, antioksidan alami yang terdapat dalam tanaman dapat digunakan sebagai alternatif dan pengembangan senyawa antioksidan alami terus dilakukan (Sari, 2016)

Asam sinamat dan turunannya merupakan zat dengan komposisi tinggi pada kemenyan Toba (19-30%) yang memiliki berbagai efek farmakodinamik dan dapat digunakan sebagai bahan baku obat (Burger *et al.*, 2016; Lembaga Penelitian Kimia Hasil Hutan, 1970; Noni, 2017). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa asam sinamat merupakan senyawa yang berpotensi sebagai terapi untuk dermatofitosis (Guzman, 2014; Korosec *et al.*, 2013; Sova, 2012). Asam sinamat dan derivatnya juga efektif terhadap *Plasmodium falciparum* (Kanaani *et al.*, 1992; Seck, 2019; Zofou *et al.*, 2012).

Selain memiliki aktivitas farmakologis yang bermanfaat, kemenyan Toba juga tidak menimbulkan efek toksik pada tubuh. Asam sinamat dan derivatnya juga memiliki toksisitas yang rendah. Kedua senyawa ini juga memiliki toksisitas rendah terhadap *Human Umbilical Vein Endothelial Cell*, bahkan tidak ada (Guzman, 2014; Hidayat *et al.*, 2018; Kanaani *et al.*, 1992). Menurut pedoman pelaksanaan pendaftaran obat herbal terstandar oleh Badan Pengawas Obat dan Makanan

(BPOM), uji toksisitas diperlukan untuk melihat keamanannya. Uji preklinik ini dilakukan secara *in vitro* pada hewan coba. Salah satu jenis hewan coba yang dapat digunakan adalah larva udang *Artemia salina* (Nauplius) (Dewoto, 2007).

Selama ini di Indonesia pemanfaatan getah dari pohon kemenyan Toba adalah sebagai bahan kayu bakar, dupa, dan campuran rokok (Katz et al., 1997). Petani ataupun pejabat pemerintah daerah asal kemenyan Toba di Sumatera Utara menggunakan resin (getah kemenyan) dengan kualitas buruk sebagai dupa (Siregar, 2018; Sitompul, 2011).

Di luar negeri, kemenyan sudah digunakan sebagai bahan baku pengobatan tradisional sejak dulu. Beberapa penyakit seperti ulkus peptikus, penyakit kulit, dan batuk diketahui dapat dikurangi gejalanya menggunakan kemenyan (Scheuba et al., 2017). Pada masa kini, ekstrak kemenyan diketahui memiliki efek antihipertensi, penyembuhan luka, antikonvulsan, dan antioksidan (Camarda et al., 2011). Kemenyan juga digunakan dalam industri farmasi, bahan pengawet, parfum, kosmetik, aromaterapi, dupa, campuran rokok kretek, dan lain-lain. Selain itu, kemenyan dapat dimanfaatkan langsung sebagai obat luka pencegah infeksi atau sebagai stimulan dengan cara dilarutkan terlebih dahulu dalam alkohol (Rahmawati, 2012). Kemenyan Toba memiliki kandungan asam sinamat yang tinggi dan memiliki kualitas getah yang paling baik diantara kemenyan jenis lain. Selain itu, kemenyan Toba juga sering dipakai oleh masyarakat (Burger et al., 2016; Siregar, 2018).

Pemanfaatan kemenyan Toba dalam praktik kesehatan di Indonesia masih terbatas, padahal di luar negeri sudah dibuat dalam berbagai sediaan untuk bermacam-macam penggunaan. Kemenyan Toba di Indonesia belum pernah dibuat sebagai obat atau suplemen (Katz et al., 1997). Sebagai pembanding, kemenyan yang berasal dari Jepang (*Styrax japonicus*) sudah dibuat dalam bentuk suplemen untuk meningkatkan imunitas tubuh (Harikrishnan et al., 2011). Oleh karena itu, pengujian aktivitas farmakologi dan toksisitas kemenyan Toba perlu dilakukan untuk memberikan informasi bagi pengembangan dan pemanfaatan kemenyan Toba sebagai salah satu alternatif pengobatan herbal.

Sebelumnya, pengujian aktivitas antioksidan dan toksisitas tingtur kemenyan sudah pernah dilakukan menggunakan kemenyan yang berasal dari Tapanuli Utara, Pakpak Bharat, dan Humbang Hasundutan oleh Hidayat et al., 2018 dengan pelarut metanol 99%. Kebaruan dari penelitian ini ialah menguji

aktivitas antioksidan dan toksisitas kemenyan Toba dengan pelarut etanol 70% yang lebih ramah terhadap kulit dan dinilai berdasarkan lima kali pengenceran.

### 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang, didapatkan rumusan masalah sebagai berikut:

1. Bagaimana aktivitas antioksidan tingtur kemenyan Toba secara *in vitro*?
2. Bagaimana toksisitas tingtur kemenyan Toba terhadap larva *Artemia salina* pada uji *in vitro*?

### 1.3. Tujuan penelitian

1. Mengetahui aktivitas antioksidan tingtur kemenyan Toba pada uji *in vitro*
2. Mengetahui apakah tingtur kemenyan Toba memiliki efek toksik terhadap larva *Artemia salina* pada uji *in vitro*



## 1.4 Keaslian Penelitian

**Tabel 1.** Keaslian Penelitian

Judul dan Penulis	Paramater yang dilihat	Hasil	Parameter penelitian saat ini
(Hidayat <i>et al.</i> , 2018) "Radical Scavenging Activity of Kemenyan Resin Produced by an Indonesian Native Plant, <i>Styrax sumatrana</i> "	<b>Objek dan Subjek penelitian</b> Senyawa $C_{18}H_{12}N_5O_6$ dan larva <i>Artemia salina</i>  <b>Variabel bebas:</b> Kemenyan Tapanuli Utara, Pakpak Bharat, Humbang Hasundutan yang dilarutkan metanol 99%.  <b>Variabel terikat:</b> Aktivitas antioksidan dan uji toksisitas resin kemenyan Tapanuli Utara, Pakpak Bharat, Humbang Hasundutan.	Resin kemenyan memiliki kemampuan tinggi dalam inhibisi molekul radikal bebas. Pada uji BSLT ( <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> ), resin kemenyan menunjukkan hasil toksisitas rendah dengan nilai diatas 0,05 g/L.	<b>Objek dan subjek penelitian</b> Senyawa $C_{18}H_{12}N_5O_6$ dan larva <i>Artemia salina</i>  <b>Variabel bebas:</b> Tingtur kemenyan Toba dengan lima konsentrasi yaitu 200 g/L, 100 g/L, 50 g/L, 25 g/L, dan 12,5 g/L.  <b>Variabel terikat:</b> Aktivitas antioksidan dan toksisitas tingtur kemenyan Toba
(Rahmawati, 2012) "Aktivitas Antiinflamasi Senyawa Asam Sinamat dari Kemenyan Pada Tikus Galur Wistar"	<b>Subjek penelitian</b> Tikus jantan galur <i>Wistar</i> dan Larva <i>Artemia salina</i>  <b>Variabel bebas:</b> isolat asam sinamat dari <i>Styrax benzoin</i>  <b>Variabel terikat:</b> Aktivitas antiinflamasi dan toksisitas	Asam sinamat dari kemenyan memiliki aktivitas antiinflamasi secara in vivo dan tidak memiliki potensi hayati ( $LC_{50}$ 429 ppm) pada uji BSLT.	<b>Objek dan subjek penelitian</b> Senyawa $C_{18}H_{12}N_5O_6$ dan Larva <i>Artemia salina</i>  <b>Variabel bebas:</b> Tingtur kemenyan Toba dengan lima konsentrasi yaitu 200 g/L, 100 g/L, 50 g/L, 25 g/L, dan 12,5 g/L. <b>Variabel terikat:</b> Aktivitas antioksidan dan toksisitas tingtur kemenyan Toba
(Du <i>et al.</i> , 2016) "Antibacterial, anti-biofilm and anticancer potentials of green synthesized silver nanoparticles using benzoin gum ( <i>Styrax benzoin</i> ) extract"	<b>Subjek penelitian</b> <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. Coli</i> dan <i>C. tropicalis</i> , $C_{18}H_{12}N_5O_6$ , dan sel keratinosit.  <b>Variabel bebas:</b> Sintesis AgNPs, ekstrak <i>Styrax benzoin</i>  <b>Variabel terikat:</b> Uji antimikroba, anti-biofilm, anti- oksidan, dan efek sitotoksik	AgNPs ekstrak <i>Styrax benzoin</i> memiliki aktivitas antibakteri terhadap dan biofilament. AgNPs memiliki aktivitas antioksidan dan tidak menimbulkan efek toksik pada sel keratinosit manusia.	<b>Objek dan subjek penelitian</b> Senyawa $C_{18}H_{12}N_5O_6$ dan Larva <i>Artemia salina</i>  <b>Variabel bebas:</b> Tingtur kemenyan Toba dengan lima konsentrasi yaitu 200 g/L, 100 g/L, 50 g/L, 25 g/L, dan 12,5 g/L. <b>Variabel terikat:</b> Aktivitas antioksidan dan toksisitas tingtur kemenyan Toba

## 1.5 Manfaat Penelitian

1. Manfaat teoritis: menambah informasi ilmiah mengenai aktivitas antioksidan dan efek toksik kemenyan Toba.
2. Manfaat metodologis: menambah metode pengujian aktivitas antioksidan dan toksisitas kemenyan Toba dengan metode yang sudah dimodifikasi.
3. Manfaat aplikatif: sebagai pengembangan dalam pemanfaatan kemenyan

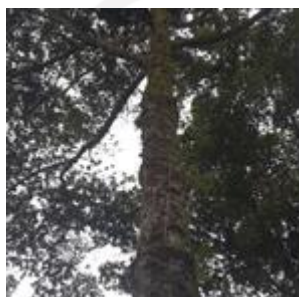


## BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tinjauan Pustaka

#### 2.1.1 Kemenyan

Pohon kemenyan (Gambar 1a) memiliki tinggi sekitar 18-meter dengan karakteristik batang tegak, berkayu, bulat, halus, percabangan sympodial, dan berwarna coklat muda. Daunnya lonjong, tunggal, berseling, dan tersebar. Pohon ini menghasilkan resin atau getah yang disebut kemenyan (Gambar 1b) (Rahmawati, 2012).



1a



1b

**Gambar 1.** Pohon kemenyan (a) dan kemenyan (b) (Dokumentasi primer)

Kemenyan (resin benzoin), dengan nama ilmiah *Styrax*, adalah genus dari 130 spesies pepohonan kecil yang ada di famili *Styracaceae*. Spesies dari *Styrax* tersebar di seluruh dunia, termasuk di Asia Tenggara, yaitu Indonesia, Laos, Vietnam dan Thailand. Provinsi Sumatera Utara merupakan provinsi dengan distribusi *Styrax* yang paling banyak, dengan produksi 4.460 ton per tahun. Terdapat 3 spesies dari *Styrax* yang ditemukan di Sumatera Utara, yaitu kemenyan Toba (*Styrax sumatrana*), kemenyan durame, dan kemenyan bulu. Adanya spesies ini penting bagi komunitas masyarakat Sumatera Utara, karena berkontribusi pada 70-80% pendapatan petani dan digunakan sebagai dupa hingga campuran rokok (Susilowati *et al.*, 2018).

Klasifikasi tanaman kemenyan sebagai berikut (Pasaribu *et al.*, 2013). Kingdom: *Plantae*, Divisi: *Magnoliophyta*, Kelas: *Magnoliopsida*, Ordo: *Ebenales*, Famili: *Styracaceae*, Genus: *Styrax*, Spesies: *Styrax sumatrana* sinonim *Styrax paralleloneurum*.

Berbagai spesies *Styrax* sudah digunakan sebagai bahan baku pengobatan tradisional sejak dulu seperti simtom ulkus peptikus, penyakit kulit, dan batuk (Scheuba *et al.*, 2017). Pada masa kini, ekstrak *Styrax* diketahui

memiliki efek antihipertensi, penyembuhan luka, antikonvulsan, dan antioksidan (Camarda *et al.*, 2011). Kemenyan juga digunakan sebagai zat tambahan pengawet, parfum, kosmetik, aromaterapi, dupa, campuran rokok kretek, farmasi, dan lain-lain. Kemenyan dapat dimanfaatkan langsung sebagai obat luka pencegah infeksi atau sebagai stimulan dengan cara dilarutkan dalam alkohol (Susilowati *et al.*, 2018).

Di luar negeri kemenyan sudah diimplementasikan sebagai obat (Katz *et al.*, 1997). Baik dalam bentuk getah, ekstrak, tingtur, maupun produk olahan lain, untuk bermacam-macam penggunaan. Di Kanada, getah kemenyan dibuat sebagai sediaan topikal dan dipakai sebagai antiseptik. Sebagai olahan tingtur, Malaysia telah menggunakan kemenyan Indonesia sebagai pencegahan kaki bengkak dikarenakan efek farmakodinamiknya yang dapat menghilangkan cairan pada jaringan edem. Di Amerika, tingtur ini digunakan sebagai protektan mukosa mulut dan penyembuhan luka. Bersama dengan komponen inaktif lain, kemenyan sebagai bahan aktif dijadikan *friar's balsam* yang berkhasiat sebagai dekongestan. Selain itu produk tingtur ini juga dapat digunakan untuk menutup luka bekas operasi (Ibrahim *et al.*, 2016; Mihir *et al.*, 2016; Rahmawati, 2012).

### 2.1.2 Uji Antioksidan

Antioksidan adalah molekul yang mampu menetralkan radikal bebas dengan menerima atau memberikan elektron untuk mengeliminasi kondisi tidak stabil radikal. Proses penghancuran radikal bebas secara langsung menyebabkan pembentukan radikal bebas baru yang pasif dan dapat diterminasi oleh antioksidan lain (Lü *et al.*, 2010).

Antioksidan dapat mencegah penyakit kardiovaskular, kanker, dan penuaan. Uji antioksidan secara *in vitro* dapat dilakukan salah satunya dengan uji *2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate* (DPPH), yang merupakan radikal bebas stabil. Pengujian menggunakan metode DPPH merupakan uji antioksidan paling banyak digunakan untuk mengevaluasi aktivitas *radical scavenging* obat baru. Saat larutan DPPH dicampur substansi donor atom hidrogen (antioksidan), akan terjadi perubahan DPPH menjadi *diphenylpicrylhydrazine* yang bersifat non-radikal, yang ditandai dengan berkurangnya warna ungu menjadi kuning pucat (Lobo *et al.*, 2010; Shekhar *et al.*, 2014).

Variabel yang diukur sebagai indikator aktivitas antioksidan adalah *the half-maximal inhibition concentration* ( $IC_{50}$ ). Nilai  $IC_{50}$  adalah konsentrasi inhibisi secara *in vitro* yang diperlukan untuk menghambat aktivitas transportasi protein hingga

50%. Ukuran yang bersifat kuantitatif ini dapat memberikan informasi mengenai potensi obat antagonis dalam penelitian farmakologi. Nilai  $IC_{50}$  diperoleh dari persamaan regresi linier % penghambatan radikal DPPH terhadap beberapa konsentrasi senyawa. Nilai  $IC_{50}$  adalah konsentrasi efektif ekstrak yang dibutuhkan untuk meredam 50% dari total DPPH, sehingga nilai 50 disubstitusikan untuk nilai y. Setelah mensubstitusikan nilai 50 pada nilai y didapat nilai x sebagai nilai  $IC_{50}$  (Brody, 2018; Tristantini *et al.*, 2016).

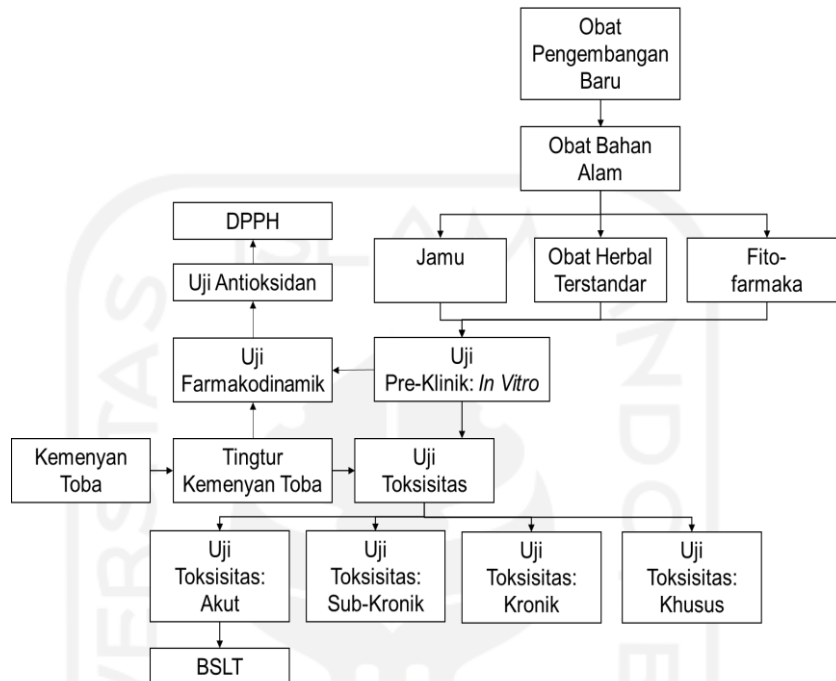
### 2.1.3 Uji Toksisitas

Uji toksisitas merupakan indikator penting studi *in vitro*. Uji *in vitro* ini dapat dilakukan dengan berbagai metode, di antaranya adalah *bioassay*. Metode *bioassay* toksisitas yang sering digunakan adalah *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT), dengan menggunakan spesies *Artemia salina*. Respon dari *Artemia salina* terhadap toksisitas memiliki kemiripan dengan sistem dari mamalia, di antaranya adalah karena RNA *polymerase* dari *Artemia salina* merupakan tipe yang mirip dengan RNA *polymerase* yang terdapat pada mamalia. Selain itu, *bioassay* juga memiliki kelebihan dari sisi standarisasi dan kontrol kualitas dari produk-produk botani yang heterogen dan memiliki campuran komponen bioaktif yang berasal dari produk botani yang sama atau berbeda-beda (Aslanturk, 2016; Elhardallou, 2011).

Uji toksisitas secara umum dibagi menjadi dua, yaitu uji toksisitas yang bertujuan untuk mengevaluasi efek suatu senyawa pada hewan eksperimental dan uji toksisitas yang bertujuan untuk mengevaluasi secara spesifik (uji toksisitas khusus) seperti uji potensial, uji reproduksi, uji mutagenik, uji karsinogenik, uji kulit, uji mata, dan uji perilaku. Uji toksisitas yang bertujuan mengevaluasi efek senyawa pada hewan eksperimental dapat dibagi menjadi uji toksisitas akut sub-kronik, dan kronik. Perbedaan ketiga uji ini terletak pada lama pemberian atau pemejanaan senyawa uji, sifat, sasaran, dan luarannya. Uji toksisitas akut bertujuan untuk menentukan *the half-maximal lethal dose* ( $LD_{50}$ ), yaitu dosis yang dapat mematikan 50% hewan coba, menilai berbagai gejala toksik, spektrum efek toksik pada organ, dan cara kematian. Semua jenis obat yang akan diberikan kepada manusia perlu dilakukan uji  $LD_{50}$ . Lama pemberian uji toksisitas akut pada manusia adalah dengan dosis tunggal atau kurang dari 1 minggu dan lama pemberian obat pada hewan coba selama 2 minggu - 1 bulan. Uji toksisitas subkronik dan kronik bertujuan untuk mengetahui efek toksik obat tradisional pada pemberian jangka lama. Uji toksisitas khusus bukan merupakan persyaratan mutlak bagi setiap obat

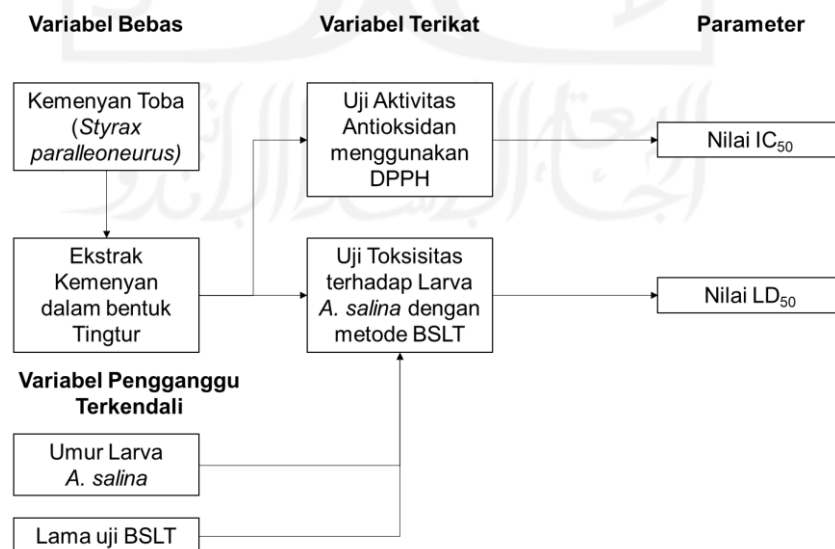
tradisional agar masuk tahap uji klinik. Uji BSLT sendiri sebenarnya termasuk uji toksisitas akut, namun karena bukan termasuk penelitian *in vivo*, maka lebih tepat dikategorikan sebagai uji toksisitas pendahuluan (Dewoto, 2007; Hayes *et al.*, 2019).

## 2.2 Kerangka Teori



Gambar 2. Kerangka Teori

## 2.3 Kerangka Penelitian



Gambar 3. Kerangka Penelitian

#### 2.4 Hipotesis Penelitian

1. Tingtur kemenyan Toba memiliki aktivitas antioksidan kuat dalam uji antioksidan menggunakan DPPH.
2. Tingtur kemenyan Toba memiliki memiliki efek toksik rendah dalam uji toksisitas menggunakan BSLT.



## **BAB III. METODE PENELITIAN**

### **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan *post-test control group design*.

### **3.2 Subyek Penelitian**

Subyek penelitian menggunakan larva *Artemia salina* (Nauplius) untuk uji toksisitas sebanyak 60 larva, di mana telur Nauplius dibeli melalui *e-commerce* Tokopedia dengan merek *Supreme Plus*, *Golden West Artemia*<sup>TM</sup> dan ditetaskan sendiri. Kriteria inklusi dalam penelitian ini adalah Nauplius dengan usia 24 jam setelah menetas. Sedangkan kriteria eksklusinya adalah Nauplius yang mati dalam kurun waktu 24 jam setelah menetas. Terdapat 6 kelompok pada uji toksisitas, 5 kelompok dengan konsentrasi pengenceran yang berbeda ditambah 1 kelompok kontrol negatif (tidak diberikan apa-apa). Subyek penelitian *Artemia salina* sebanyak 10 larva dibagi ke dalam 6 kelompok dengan tiga kali pengulangan (Hidayat et al., 2018; Mirzaei et al., 2013; Sarah et al., 2017).

Adapun pengujian antioksidan dilakukan secara *in vitro*. Terdapat tiga kelompok perlakuan yaitu kelompok kemenyan Toba, kontrol positif dengan vitamin C, dan kontrol negatif tanpa pemberian senyawa uji. Kelompok kemenyan Toba terdiri atas 5 kelompok dengan konsentrasi pengenceran yang berbeda. Metode pengujian antioksidan adalah menggunakan senyawa 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl/DPPH (C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>).

Kemenyan diperoleh dari pasar sentra Kemenyan di Kecamatan Doloksanggul, Kabupaten Humbang Hasundutan, Sumatra Utara Indonesia.

### **3.3 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian uji antioksidan dan toksisitas telah dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Indonesia (UII). Penelitian dilakukan dalam rentang waktu antara Januari 2020 sampai dengan Mei 2020.

### **3.4 Variabel Penelitian**

#### **3.4.1 Variabel Terikat**

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah perubahan warna pada uji DPPH (uji antioksidan) dan jumlah kematian *Artemia salina* (uji toksisitas).

#### **3.4.2 Variabel Bebas**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah:

1. Sediaan tingtur kemenyan Toba dalam lima konsentrasi, yaitu 200 g/L, 100 g/L, 50 g/L, 25 g/L, dan 12,5 g/L.
2. Kontrol positif: vitamin C dengan konsentrasi 0,1%.
3. Kontrol pelarut: etanol dengan konsentrasi 70%.
4. Kontrol negatif: tanpa perlakuan apapun.

### 3.5 Definisi Operasional

1. Tingtur kemenyan Toba dalam penelitian ini adalah kemenyan Toba yang dilarutkan dalam etanol 70 % dalam lima kelompok dengan konsentrasi yaitu 200 g/L, 100 g/L, 50 g/L, 25 g/L, dan 12,5 g/L.
2. Uji antioksidan dalam penelitian ini merupakan penilaian kemampuan kemenyan Toba dalam meredam radikal bebas menggunakan metode DPPH, dinyatakan dengan nilai  $IC_{50}$  yaitu konsentrasi yang diperlukan untuk menghambat aktivitas radikal bebas hingga 50% dan dinyatakan dalam satuan g/L. Suatu zat dikatakan memiliki sifat antioksidan apabila nilai  $IC_{50}$  kurang dari 0,2 g/L, bila nilai  $IC_{50}$  yang diperoleh berkisar antara 0,2-1 g/L, maka zat tersebut kurang aktif namun masih berpotensi sebagai memiliki aktivitas antioksidan. Jika nilai  $IC_{50}$  lebih dari 1 g/L maka dapat dikatakan zat tersebut memiliki aktivitas antioksidan yang sangat lemah.
3. Uji toksisitas dalam penelitian ini merupakan pengukuran uji toksisitas akut kemenyan Toba terhadap larva *Artemia salina*, dinyatakan dengan nilai *the-half maximal lethal dose* ( $LD_{50}$ ), yaitu dosis yang dapat mematikan 50% hewan coba, menilai berbagai gejala toksik, spektrum efek toksik pada organ, dan cara kematian. dan dinyatakan dalam satuan g/L. Suatu ekstrak dikatakan sangat toksik apabila nilai  $LC_{50} \leq 0,03$  g/L, toksik apabila nilai  $LC_{50} \leq 1$  g/L, dan tidak toksik apabila nilai  $LC_{50} > 1$  g/L.

### 3.6 Alat dan Bahan Penelitian

#### 3.6.1 Alat Penelitian

1. Spektrofotometer
2. Tabung reaksi 30 mL
3. Inkubator
4. Akuarium
5. Gelas ukur 100 mL
6. Spatula
7. Pompa udara

8. Pipet Pasteur
9. Lampu 60 watt
10. Mikropipet
11. Tabung reaksi 200 mL
12. Kaca pembesar

### **3.6.2 Bahan Penelitian**

1. Larva *A. salina* (Nauplius)
2. Garam 27 gram
3. Etanol 70%
4. Kemenyan
5. DPPH
6. Asam askorbat

### **3.7 Alur Penelitian**

#### **3.7.1 Pembuatan Tingtur Kemenyan Toba (Tahap 1)**

Kemenyan diperoleh dari pasar sentra Kemenyan di Kecamatan Doloksanggul, Kabupaten Humbang Hasundutan, Sumatra Utara Indonesia. Tingtur kemenyan Toba dengan konsentrasi 200 g/L dibuat berdasarkan Farmakope Indonesia dengan sedikit modifikasi (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1965). Sebanyak 200 g kemenyan dihaluskan menggunakan mesin penggerus. Bubuk kemenyan dicampur dengan etanol 70% sampai volume mencapai 1 L. Dalam ruang tertutup larutan ditunggu selama 7 hari (maserasi). Larutan kemudian difiltrasi menggunakan kertas saring. Setelah dilakukan maserasi dan filtrasi, larutan ditambahkan etanol hingga mencapai 1000 ml (1 L). Hasil akhir yang diperoleh adalah tingtur kemenyan dengan warna coklat kemerahan. Tingtur yang dihasilkan dianggap sebagai larutan stok.

#### **3.7.2 Penyiapan Larutan (Tahap 2)**

Tingtur kemenyan yang diperoleh dari langkah sebelumnya (tahap 1). Selanjutnya dibuat larutan dengan konsentrasi 100 g/L, 50 g/L, 25 g/L dan 12,5 g/L dengan cara pengenceran menggunakan larutan etanol 70%. Pengenceran dilakukan dengan cara mengambil 100 ml larutan awal dan menambahkan etanol 100 ml ke larutan berikutnya, demikian seterusnya hingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 12,5 g/L (Gambar 4). Larutan stok dengan konsentrasi 200 g/L dibuat serial pengenceran dengan konsentrasi 100 g/L, 50 g/L, 25 g/L dan 12,5 g/L. Pengenceran memiliki konsentrasi setengah dari konsentrasi sebelumnya



didasarkan pada penelitian sebelumnya oleh Suzery, 2014 yang juga melakukan serial pengenceran dengan setengah konsentrasi (Suzery, 2014).

Penambahan 100 ml (0,1 L) etanol ke larutan berikutnya yang berisi 100 ml (0,1 L) larutan awal didapatkan menggunakan rumus (1) sebagai berikut:

$$K1 \times V1 = K2 \times V2 \dots \dots \dots (1)$$

Dimana, K1: konsentrasi awal (g/L), K2: konsentrasi yang diinginkan (g/L), V1: volume total awal / larutan yang diambil (L), dan V2 volume total akhir (L). Volume total merupakan penjumlahan volume etanol ditambah volume kemenyan. Untuk mendapatkan volume etanol: dVa (L), diperlukan rumus (2) sebagai berikut:

$$dVa = V2 - V1 \dots \dots \dots (2)$$

Sebagai contoh, larutan stok pada tabung 1 dengan konsentrasi 200 g/L (K1) diambil 0,1 L (V1) dan dimasukkan ke dalam tabung 2. Konsentrasi yang diinginkan di tabung 2 adalah 100 g/L (K2). Digunakan rumus (1) untuk menentukan V2.

$$200 \text{ g/L} \times 0,1 \text{ L} = 100 \text{ g/L} \times V2 \text{ L}$$

Didapatkan V2 senilai 0,2 L. Setelah itu, untuk menentukan seberapa banyak volume etanol (dVa) yang diperlukan untuk mendapatkan konsentrasi akhir digunakan rumus (2).

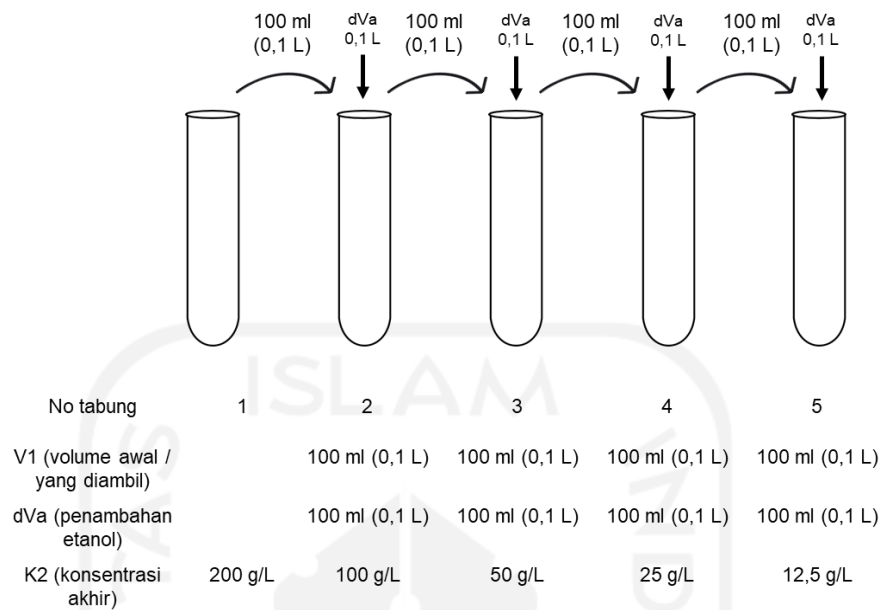
$$dVa = 0,2 \text{ L} - 0,1 \text{ L}$$

Dengan begitu diperoleh volume etanol (dVa) yang dibutuhkan untuk mendapatkan konsentrasi 100 g/L dari konsentrasi awal 200 g/L dengan volume 0,1 L adalah 0,1 L (100 ml).

Untuk mendapatkan konsentrasi ketiga konsentrasi berikutnya 50 g/L, 25 g/L dan 12,5 g/L dilakukan perhitungan menggunakan kedua rumus diatas dengan volume dan konsentrasi awal yang dimaksud adalah volume dan konsentrasi tabung sebelumnya (K1 dan V1 tabung ke-2 digunakan untuk mendapatkan konsentrasi 50 g/L pada tabung ke-3). Dikarenakan pengenceran terdiri dari keempat konsentrasi dengan kelipatan pembagian dua, maka dapat disimpulkan dengan volume total awal sebanyak 0,1 L dibutuhkan penambahan etanol sebanyak 0,1 L untuk membuat konsentrasi akhir (Gambar 4).

Larutan stok (200 g/L) diambil 100 ml (0,1 L) kemudian ditambahkan 100 ml (0,1 L) etanol untuk membuat konsentrasi 100 g/L. Dari larutan sebelumnya, diambil 100 ml (0,1 L) kemudian ditambahkan 100 ml (0,1 L) untuk membuat konsentrasi 50 g/L. Dari larutan sebelumnya, diambil 100 ml (0,1 L) kemudian ditambahkan 100 ml (0,1 L) untuk membuat konsentrasi 25 g/L. Dari larutan

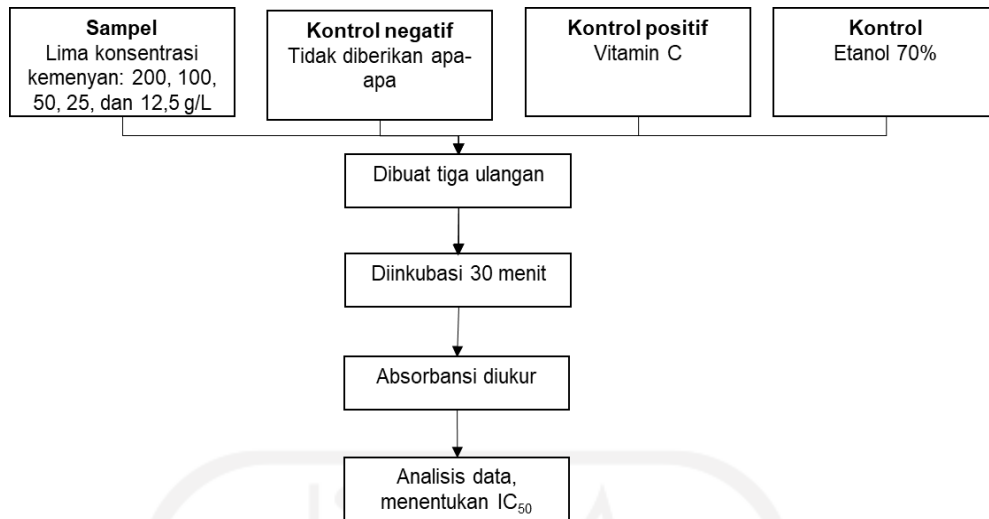
sebelumnya, diambil 100 ml (0,1 L) kemudian ditambahkan 100 ml (0,1 L) etanol untuk membuat konsentrasi 12,5 g/L.



**Gambar 4.** Pembuatan Larutan dengan Pengenceran

### 3.7.3 Uji Antioksidan

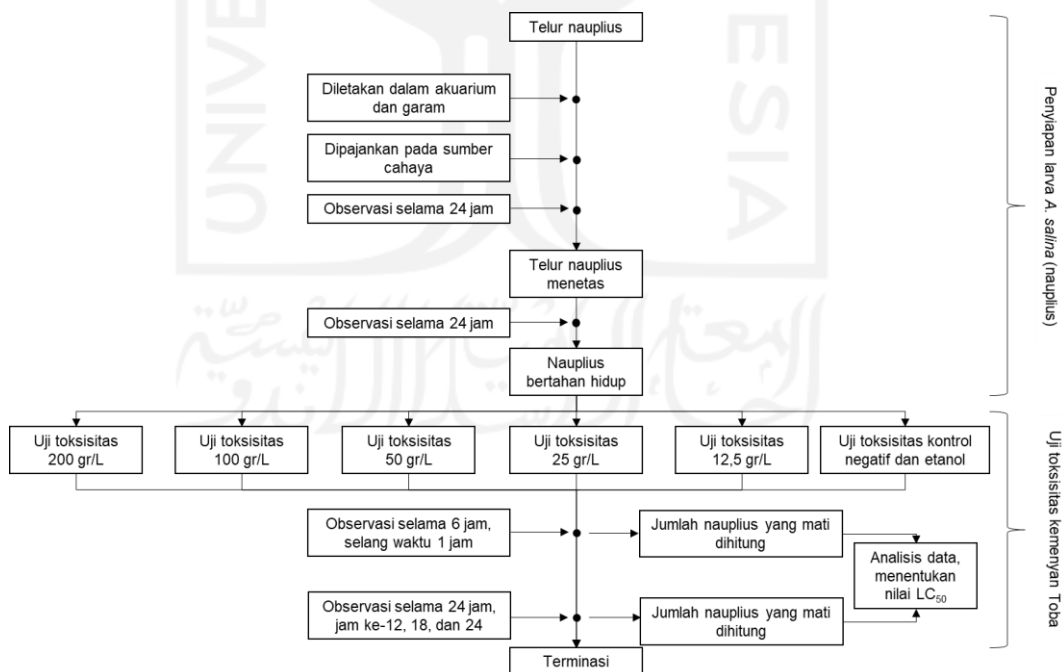
Aktivitas antioksidan kemenyan ditentukan berdasarkan metode sebelumnya (Hidayat *et al.*, 2018) dengan sedikit modifikasi. Pada tabung reaksi disiapkan keempat konsentrasi kemenyan Toba lalu ditambahkan larutan DPPH 1 M 5 ml. Disiapkan larutan perbandingan, yaitu larutan kontrol yang berisi 5 ml etanol dan 5 ml larutan DPPH 1 M, serta larutan etanol dengan vitamin C sebagai blanko atau kontrol positif. Semua sampel dibuat sebanyak tiga ulangan (triplikat). Setelah diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruangan, dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer (Gambar 5).



**Gambar 5.** Alur Penelitian Uji Antioksidan

### 3.7.4 Uji Toksisitas

Uji toksisitas dilakukan berdasarkan metode sebelumnya (Muaja *et al.*, 2013; Sarah *et al.*, 2017) dengan sedikit modifikasi (Gambar 6). Pada uji toksisitas ini terdapat dua tahap yang dilakukan, tahap 1 yaitu menyiapkan Nauplius, dan tahap 2 menguji toksisitas.



**Gambar 6.** Alur Penelitian Uji Toksisitas

### a. Penyiapan larva *A. salina* (Tahap 1)

Sebanyak tiga liter air dituangkan ke dalam akuarium dan ditambahkan 27 g garam. Dipasang ujung selang pompa udara pada bagian bawah akuarium agar sirkulasi udara lancar. Sebanyak 20 g telur Nauplius dimasukkan pada bagian permukaan air, lalu diaduk. Lampu 60 watt dinyalakan dan diletakkan beberapa sentimeter dari akuarium. Setelah 20-24 jam telur larva *A. salina* (Nauplius) akan menetas, lalu diamati. Nauplius dikumpulkan setelah 24 jam menetas. Nauplius dipisahkan dari cangkang telur dengan cara mematikan pompa udara dan lampu. Cangkang telur kosong akan mengapung, sedangkan Nauplius akan terkumpul pada bagian bawah air.

### b. Uji Toksisitas (Tahap 2)

Larutan uji dengan 5 konsentrasi kemenyan, kontrol negatif, dan kontrol pelarut (etanol 70%) masing-masing diambil sebanyak 6 mL dengan pipet dan dituangkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya dimasukkan 10 ekor Nauplius yang berumur 2 hari.

Setiap konsentrasi dilakukan tiga kali pengulangan dan dibandingkan dengan Kontrol negatif (tanpa pemberian zat apapun). Pengamatan pertama dilakukan selama 6 jam dengan selang waktu 1 jam. Selanjutnya, pengamatan kedua dilakukan pada 12, 18, dan 24 jam. Pada setiap waktu pengamatan jumlah Nauplius yang mati dihitung. Kematian Nauplius dipastikan jika tidak terdapat pergerakan selama 30 detik observasi, dan dihitung persentase kematian setelah 24 jam. Hasil observasi kematian Nauplius pada setiap jam yang ditentukan kemudian dijumlahkan. Dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Observasi dilakukan oleh dua pengamat.

Setelah mendapatkan data kematian Nauplius dilakukan penghitungan  $LD_{50}$  dengan menghitung persen mortalitas, mortalitas terkoreksi, dan reratanya. Setelah menentukan nilai probit selanjutnya dibuat grafik hubungan antara nilai probit mortalitas (sumbu Y) dan  $\text{Log}^{10}$  Konsentrasi (sumbu X) kemudian nilai X didapatkan dengan memasukkan nilai 5 ke persamaan yang didapatkan.  $LD_{50}$  didapatkan dengan  $\text{antilog}(x)$  atau  $10^x$ .

### 3.7.5 Indikator Capaian setiap Tahapan Penelitian

Dalam uji antioksidan, indikator yang akan dicapai adalah tidak ada kesalahan interpretasi warna pada uji DPPH, spektrofotometri dapat membaca

nilai absorbansi dengan akurat, dan tidak ada kesalahan saat memasukkan data ke dalam perangkat lunak uji statistik.

Dalam uji toksisitas, indikator yang akan dicapai pada setiap tahapan uji toksisitas adalah: (1) semua telur larva *A. salina* menetas, (2) semua larva *A. salina* bertahan hidup selama 24 jam dan hidup dapat dihitung.

### 3.7.6 Teknik Pengumpulan Data

Pada uji antioksidan nilai absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer. Data kemudian dimasukkan ke dalam perangkat lunak *Microsoft Excel version 2013* untuk menghitung nilai  $IC_{50}$ .

Pada uji toksisitas, larva *A. salina* yang hidup dan mati dihitung secara manual, dan data ini akan dimasukkan ke dalam perangkat lunak *IBM Software Package used for Statistical Analysis (SPSS) Statistics version 25* untuk menghitung nilai  $LD_{50}$ .

### 3.8 Analisis Data

Pada uji antioksidan, dilakukan tiga tahap analisis data untuk menentukan nilai  $IC_{50}$ . (1) Tahap pertama melihat perubahan warna masing-masing sampel setelah di inkubasi bersama DPPH. Jika warna ungu DPPH tidak berubah maka tidak ada aktivitas antioksidan, jika warna DPPH berubah menjadi kuning maka terdapat aktivitas antioksidan. (2) Tahap kedua yaitu menghitung persentase absorbansi, menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{Absorbansi} = \frac{\text{Absorban kontrol} - \text{Absorban sampel}}{\text{Absorban sampel}} \times 100\%$$

(3) Tahap ketiga adalah menilai  $IC_{50}$  menggunakan persentase absorbansi, apabila nilai yang didapatkan kurang dari 50 aktivitas antioksidan dinyatakan tinggi dan apabila lebih 50 dinyatakan rendah.

Pada uji toksisitas, persentase kematian Nauplius pada setiap tabung reaksi dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{Kematian} = \frac{\text{Jumlah Nauplius mati}}{\text{Jumlah Nauplius mati} + \text{Jumlah Nauplius hidup}} \times 100\%$$

Selanjutnya untuk menemukan data pengujian toksisitas digunakan analisis nilai  $LD_{50}$ . Analisis ini dilakukan dengan analisis probit menggunakan perangkat lunak *IBM SPSS version 25*.

### 3.9 Etika Penelitian

Penelitian ini telah mendapatkan kelayakan etik dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat, dan Keperawatan Universitas Gadjah Mada (FKKMK UGM) dengan nomor etik KE/FK/1480/EC/2019.



## BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Hasil

#### 4.1.1 Pengumpulan Kemenyan

Kemenyan diperoleh dari pasar sentra kemenyan di Kecamatan Doloksanggul, Kabupaten Humbang Hasundutan, Sumatra Utara Indonesia.

#### 4.1.2 Tingtur Kemenyan Toba

Dari pembuatan tingtur yang terdiri atas penggerusan, maserasi, dan filtrasi, didapatkan tingtur kemenyan Toba dengan konsentrasi 200 g/L dalam volume 1 L. Tingtur kemenyan Toba memiliki karakteristik warna coklat kemerahan (Gambar 7).



**Gambar 7.** Tingtur kemenyan Toba (dokumentasi primer)

#### 4.1.3 Pengenceran Larutan

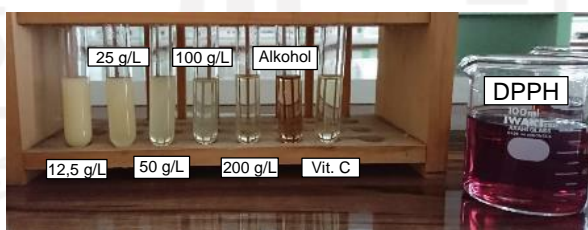
Tingtur kemenyan yang diperoleh dari langkah sebelumnya dimasukkan ke dalam botol/vial sebanyak 20 ml. Selanjutnya dilakukan pengenceran dengan mengambil 10 ml larutan konsentrasi 200 g/L dan ditambahkan etanol 10 ml untuk mendapatkan konsentrasi 100 g/L. Metode yang sama digunakan untuk membuat larutan dengan konsentrasi 50 g/L, 25 g/L dan 12,5 g/L. Didapatkan degradasi warna dari coklat kemerahan (200 g/L) hingga kuning bening (12,5 g/L) (Gambar 8).



**Gambar 8.** Larutan Hasil Pengenceran (dokumentasi primer)

#### 4.1.4 Uji Antioksidan

Pada tabung reaksi disiapkan keempat konsentrasi kemenyan Toba lalu ditambahkan larutan DPPH. Disiapkan larutan perbandingan, yaitu larutan kontrol yang berisi etanol dan larutan DPPH, serta larutan etanol dengan vitamin C sebagai kontrol positif. Terjadi perubahan warna pada DPPH yang semula berwarna ungu menjadi kuning. Semakin tinggi konsentrasi tingtur semakin bening warna yang diperoleh (Gambar 9). Vitamin C sebagai kontrol positif juga ditambahkan DPPH dan terjadi perubahan warna yang semula menjadi ungu menjadi kuning bening. Secara kualitatif, warna vitamin C menunjukkan warna yang lebih bening dibandingkan kelima konsentrasi lainnya. Etanol sebagai kontrol negatif tidak merubah warna DPPH.



**Gambar 9.** Perubahan warna DPPH pada masing-masing konsentrasi tingtur kemenyan, alkohol, dan vitamin C (dokumentasi primer)

Selanjutnya larutan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruangan. Kemudian dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer. Hasil rerata absorbansi dan persentase antioksidan yang dibuat triplikasi disajikan pada tabel 3.

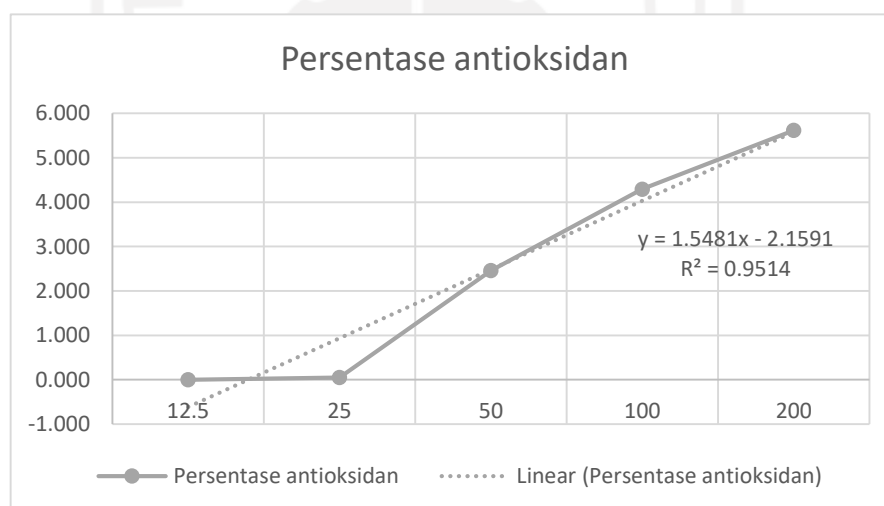


**Tabel 2.** Persentase antioksidan

Konsentrasi (g/L)	Persentase antioksidan			
	1	2	3	Rerata
12.5	0	0	0	0,000 ± 0,001
25	0,056	0,053	0,051	0,053 ± 0,002
50	2,401	2,470	2,506	2,459 ± 0,054
100	4,273	4,294	4,315	4,294 ± 0,021
200	6,418	5,279	5,164	5,620 ± 0,693

Data di atas menunjukkan bahwa aktivitas peredaman DPPH pada tingtur kemenyan Toba dengan konsentrasi tertinggi (200 g/L) adalah  $5,620 \pm 0,693$ .  $IC_{50}$  vitamin C tidak diukur karena hanya digunakan sebagai pembanding kualitatif absorbansi yang diperoleh.

Rumus persamaan garis didapatkan setelah dibuat grafik persentase antioksidan yang tersaji pada gambar 10.



**Gambar 10.** Kurva hubungan % aktivitas antioksidan terhadap konsentrasi tingtur kemenyan Toba

Dari kurva persentase antioksidan, didapatkan rumus persamaan garis  $y = 1,5481x - 2,1591$ . Nilai  $IC_{50}$  merupakan konsentrasi efektif ekstrak yang dibutuhkan untuk meredam 50% dari total DPPH, sehingga nilai sebesar 50 disubstitusikan untuk nilai y. Setelah mensubstitusikan nilai y, diperoleh nilai x sebesar 33,7 g/L sebagai nilai  $IC_{50}$ . Dengan demikian, nilai  $IC_{50}$  tingtur kemenyan Toba adalah 33,7 g/L.

#### 4.1.5 Uji Toksisitas

Setelah didapatkan larva *A. salina* (Nauplius) yang berumur dua hari, segera dilakukan uji toksisitas pada masing-masing cawan petri yang sudah disediakan larutannya (Gambar 9). Pengamatan dilakukan setiap 6, 12, 18, dan 24 jam. Pada setiap waktu pengamatan jumlah Nauplius yang mati dihitung. Kematian Nauplius dipastikan jika tidak terdapat pergerakan selama 30 detik observasi, dan dihitung persentase kematian setelah 24 jam. Hasil observasi kematian Nauplius pada setiap waktu pengamatan yang ditentukan kemudian dijumlahkan. Pengambilan data dilakukan tiga kali pengulangan untuk setiap konsentrasi.



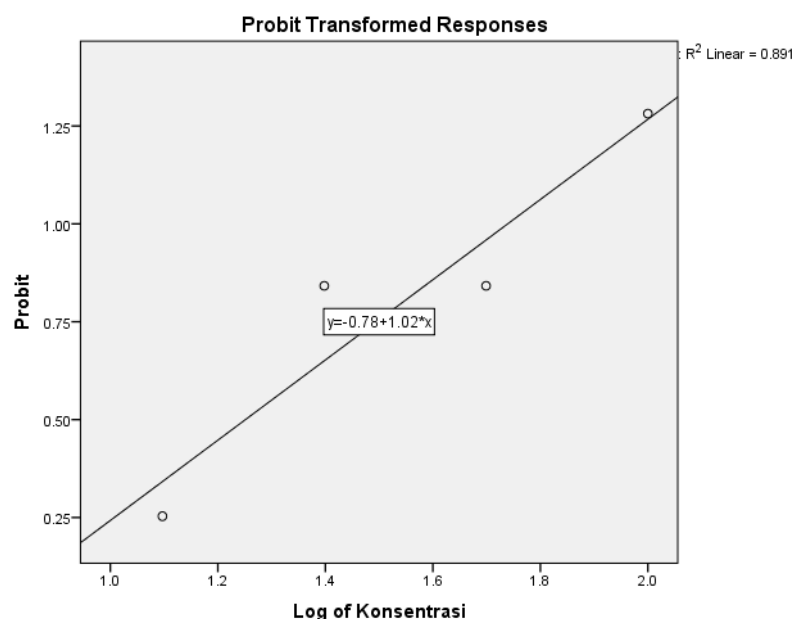
**Gambar 11.** Observasi uji toksisitas (dokumentasi primer)

Setelah semua hasil observasi kematian Nauplius didapat, selanjutnya persentase kematian Nauplius dihitung sebelum dilakukan analisis uji probit. Tabel 4 menyajikan data persentase kematian Nauplius.

**Tabel 3.** Persentase kematian Nauplius

Konsentrasi (g/L)	Persentase Jumlah Larva Mati			% Rerata Mortalitas
	1	2	3	
0	20	20	20	20
12,5	60	70	50	60
25	80	80	80	80
50	80	70	90	80
100	80	90	100	90
200	100	100	100	100

Untuk mendapatkan nilai  $LD_{50}$  tingtur kemenyan, dilakukan analisis probit dengan memasukkan persentase kematian Nauplius, tersaji pada gambar 11.



**Gambar 12.** Kurva mortalitas Nauplius pada tingtur kemenyan Toba dengan nilai  $LD_{50} = 8,006$  g/L

Berdasarkan kurva mortalitas Nauplius dari masing-masing sampel tingtur kemenyan Toba, diperoleh nilai  $LD_{50}$  sebesar 8,006 g/L.

## 4.2 Pembahasan

### 4.2.1 Tingtur Kemenyan Toba

Tingtur kemenyan Toba dengan konsentrasi 200 g/L yang telah dibuat memiliki karakteristik yang sama dengan tingtur kemenyan dalam Farmakope Indonesia, yaitu berwarna coklat kemerahan (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1965). Pelarut etanol 70% digunakan atas pertimbangan sifatnya yang tidak keras untuk penggunaan luar. Etanol banyak digunakan dalam semua jenis produk yang terpapar langsung pada kulit seperti desinfektan, kosmetik, obat kumur, penggunaan farmasi, dan produk rumah tangga. Penggunaan etanol pada kulit secara teratur dapat mengakibatkan masuknya etanol dan metabolitnya ke dalam darah, namun dengan kadar yang di bawah toksik (Lachenmeier, 2008). Produk obat inggris bernama "*Humco Benzoin Compound Tincture, USP*" yang memiliki zat aktif resin benzoin juga menggunakan etanol sebagai pelarutnya (Humco Holding Group, 2017).

### 4.2.2 Uji Antioksidan

Uji antioksidan secara *in vitro* dapat dilakukan salah satunya dengan uji *2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate* (DPPH), yang merupakan radikal bebas

stabil. Pengujian menggunakan metode DPPH merupakan uji antioksidan paling banyak digunakan untuk mengevaluasi aktivitas *radical scavenging* obat baru. Terjadi perubahan warna pada DPPH yang semula berwarna ungu menjadi kuning. Pada eksperimen yang dilakukan, semakin tinggi konsentrasi tingtur semakin tinggi perubahan warna yang terjadi. Vitamin C sebagai kontrol positif juga ditambahkan DPPH dan terjadi perubahan warna yang semula ungu menjadi kuning bening. Perubahan warna ini didasarkan pada pengurangan sifat radikal DPPH yang berwarna ungu oleh kandungan antioksidan pada tingtur kemenyan dan vitamin C. Terjadi mekanisme transfer atom hidrogen yang menyebabkan perubahan warna menjadi kuning pucat. Perubahan warna, dari ungu menjadi kuning menunjukkan penurunan absorbansi yang dapat dilihat pada alat spektrofotometer. Hal ini menunjukkan bahwa antioksidan yang ditemukan dalam larutan berinteraksi dengan radikal bebas pada DPPH. Sementara itu etanol sebagai kontrol negatif tidak merubah warna DPPH menandakan bahwa senyawa ini tidak memiliki kemampuan antioksidan (Jadid *et al.*, 2017; Sirivibulkovit *et al.*, 2018).

Nilai  $IC_{50}$  merupakan konsentrasi inhibisi yang diperlukan untuk menghambat aktivitas radikal bebas hingga 50% dari total DPPH (Brody, 2018). Perhitungan nilai  $IC_{50}$  dilakukan dengan melihat kurva persentase antioksidan terlebih dahulu untuk mendapatkan persamaan garisnya yaitu  $y = 1,5481x - 2,1591$  (Gambar 10). Karena nilai  $IC_{50}$  adalah konsentrasi efektif ekstrak yang dibutuhkan untuk meredam 50% dari total DPPH, maka nilai 50 disubstitusikan untuk nilai y. Setelah memasukkan y, didapat nilai x ( $IC_{50}$ ) sebesar 33,7 g/L. Semakin kecil nilai  $IC_{50}$  menandakan semakin rendah konsentrasi suatu senyawa dibutuhkan untuk menghambat aktivitas radikal bebas, sehingga aktivitas peredaman radikal bebas semakin tinggi. Suatu zat dikatakan memiliki sifat antioksidan apabila nilai  $IC_{50}$  kurang dari 0,2 g/L, bila nilai  $IC_{50}$  yang diperoleh berkisar antara 0,2-1 g/L, maka zat tersebut kurang aktif namun masih berpotensi sebagai memiliki aktivitas antioksidan. Jika nilai  $IC_{50}$  lebih dari 1 g/L maka dapat dikatakan zat tersebut memiliki aktivitas antioksidan yang sangat lemah (Ridho, 2013). Dalam penelitian ini aktivitas antioksidan tingtur kemenyan Toba dinyatakan rendah dengan nilai  $IC_{50}$  lebih dari 1,42 g/L. Nilai  $r^2 = 0,9514$  yang mendekati 1 dan bernilai positif menunjukkan bahwa dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak maka semakin besar aktivitas antioksidannya (Molyneux *et al.*, 2003; Ridho, 2013; Satria, 2013; Tristantini *et al.*, 2016).

Penelitian Hidayat (2018) memperlihatkan aktivitas antioksidan kemenyan menggunakan DPPH dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 0,01 sampai dengan 0,03 g/L. Jaradat *et al.*, (2018) mengidentifikasi aktivitas antioksidan pada genus *Styrax* dengan metode DPPH dan mendapatkan nilai 0,015 yang mana mengindikasikan aktivitas tinggi penghambatan radikal bebas (Hidayat *et al.*, 2018; Jaradat *et al.*, 2018). Selain itu dalam penelitian oleh Du (2016) memperlihatkan bahwa sintesis AgNPs dari ekstrak kemenyan juga memiliki aktivitas antioksidan nilai  $IC_{50}$  sebesar 0,47 g/L (Du *et al.*, 2016). Penelitian oleh Hidayat (2018) memiliki kemiripan dengan penelitian ini baik dalam segi metode dan jenis kemenyan, namun hasil yang diperoleh berbeda. Hal yang membedakan ialah pelarut yang dipakai, dalam penelitian Hidayat (2018) metanol 99% digunakan sebagai pelarut sedangkan dalam penelitian ini menggunakan pelarut etanol 75%. Etanol merupakan pelarut yang bagus untuk ekstraksi kandungan polifenol dan aman bagi manusia. Berkebalikan dengan etanol, metanol bersifat keras terhadap sel-sel manusia namun memiliki tingkat efisien yang lebih baik terhadap kandungan ekstrak polifenol dengan berat molekul tinggi (Do *et al.*, 2014). Asam sinamat sebagai dan flavonoid sebagai zat yang diduga memiliki aktivitas antioksidan memiliki berat molekul masing-masing 148.16 g/mol dan 284 g/mol (*National Center for Biotechnology Information*, 2020).

Suatu penelitian telah mengidentifikasi kandungan kimia kemenyan Toba dan kuantifikasi masing-masing zat kimia kandungan tersebut memakai peralatan berbasis *chromatography* (Burger *et al.*, 2016). Hasil tersebut dihitung nilai rata-ratanya dalam bentuk persentase: asam sinamat (19%), vanila (1%), asam benzoat (3%), benzyl benzoat (1%), sinamil sinamat (6%), p-coumaryl sinamat (16,5%), komponen volatil yang tidak diketahui (2%), komponen non volatil yang tidak diketahui (12,75%), dan komponen yang tidak diketahui senyawanya (30,75%). Asam sinamat merupakan kandungan aktif paling tinggi pada kemenyan Toba. Lembaga Penelitian Kimia Hasil Hutan (1970) juga memperlihatkan kandungan asam sinamat pada kemenyan sebesar 30% dari seluruh komposisinya (Lembaga Penelitian Kimia Hasil Hutan, 1970). Diduga komposisi asam sinamat memainkan peran dalam aktivitasnya mencegah pembentukan radikal bebas. Asam sinamat merupakan intermediet jalur metabolisme *shikimate* dan *phenylpropanoid* dan merupakan prekursor flavonoid dan lignin. Selain toksisitasnya yang rendah dan sering ditemukan pada tumbuhan, asam sinamat dan derivatnya memiliki aktivitas farmakologis. Asam hidroksisinamat merupakan

komponen fenolik yang memiliki aktivitas antioksidan tinggi. Senyawa ini memiliki gugus grup hidroksil fenolik yang bereaksi dengan oksidan dan radikal bebas untuk membuat radikal fenolik yang stabil. Selain itu, senyawa ini juga memiliki rantai propenoic yang mengkonjugasi ikatan ganda dengan resonansi sehingga memiliki efek stabilisasi radikal fenolik. Derivat asam sinamat juga memiliki efek *scavenging* pada radikal bebas dengan inhibisi oksidasi lipid atau menghambat aktivitas anion superoksida (Sova, 2012). Belum diketahui kandungan utama dari kemenyan Toba ini, sehingga tidak dapat dipastikan komponen apa yang berkontribusi paling besar terhadap aktivitas antioksidan ini, dan tentunya hal ini perlu dikaji lebih lanjut.

Pauletti, *et al* (2006) melaporkan, bahwa genus *Styrax* mengandung 30 jenis senyawa fenolat yang berhubungan dengan asam sinamat. Terdapat hubungan linear antara kandungan total fenolat dan flavonoid dengan aktivitas antoksidan. Senyawa fenolat memiliki kemampuan reduksi oksidasi (redoks) sehingga dapat berperan sebagai agen reduksi, donor hidrogen, dan kuenser oksigen singlet (Hidayat *et al.*, 2018; Pauletti *et al.*, 2006). Reaksi redoks berperan penting dalam mempertahankan fungsi seluler seperti siklus metabolisme (misalnya daur ulang NAD<sup>+</sup> dan NADH) dan detoksifikasi zat berbahaya. Reaksi ini biasanya difasilitasi oleh suatu enzim. Satu reaktan kehilangan elektron (menjadi teroksidasi/bertambah) sedangkan yang lain mendapatkan elektron yang sama (menjadi berkurang). Akibatnya, sel-sel berusaha menjaga keseimbangan listrik antara makromolekul yang menyusunnya. Antioksidan berperan dalam mempertahankan keseimbangan ini dengan menangkai produksi spesies reaktif yang berkelanjutan (Fraunberger *et al.*, 2016).

#### 4.2.3 Uji Toksisitas

Uji toksisitas metode BSLT sering dipakai untuk menilai efek samping suatu zat pada tanaman obat yang berpotensi memiliki aktivitas farmakologi. Uji toksisitas akut ini bertujuan untuk menentukan *the half-maximal lethal dose* (LD<sub>50</sub>), yaitu dosis yang dapat mematikan 50% hewan coba, menilai berbagai gejala toksik, spektrum efek toksik pada organ, dan cara kematian. Semua jenis obat yang akan diberikan kepada manusia perlu dilakukan uji LD<sub>50</sub>. Sampel yang digunakan dalam metode BSLT ini ialah larva udang *Artemia salina* atau Nauplius. Sampel ini digunakan karena memiliki kemiripan respon dengan mamalia terhadap toksisitas. Lebih lanjut, RNA *polymerase* dari *Artemia salina* mirip dengan yang terdapat pada mamalia. Selain itu, *bioassay* ini juga memiliki kelebihan dari sisi

standarisasi dan kontrol kualitas dari produk-produk botani yang heterogen dan memiliki campuran komponen bioaktif yang berasal dari produk botani yang sama maupun yang berbeda-beda. Metode ini juga mudah dikembangkan, murah, dan singkat dalam pelaksanaannya (Aslanturk, 2016; Dewoto, 2007; Elhardallou, 2011; Hayes et al., 2019; Wahyu Ningdyah et al., 2015).

Berdasarkan analisis probit, diperoleh nilai  $LD_{50}$  tingtur kemenyan Toba adalah sebesar 8,006 g/L. Nilai ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi 8,006 g/L, tingtur kemenyan Toba mampu membunuh larva udang sampai 50% populasi. Menurut Meyer *et al.*, 1982, suatu ekstrak dikatakan sangat toksik apabila nilai  $LC_{50} \leq 0,03$  g/L, toksik apabila nilai  $LC_{50} \leq 1$  g/L, dan tidak toksik apabila nilai  $LC_{50} > 1$  g/L. Berdasarkan nilai  $LC_{50}$  tersebut, maka tingtur kemenyan merupakan senyawa yang tidak toksik. Hasil yang sama juga diperoleh pada penelitian oleh Hidayat, *et al.* (2018) yang menunjukkan bahwa tingtur kemenyan dikategorikan sebagai senyawa yang tidak toksik dengan nilai di atas 0,5 g/L (Hidayat *et al.*, 2018).

Beberapa penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa kemenyan bersifat tidak toksik. Oliveira *et al.* (2016) dalam penelitiannya memperlihatkan bahwa kemenyan dengan genus *Styrax camporum* tidak bersifat toksik terhadap sel manusia normal (Oliveira *et al.*, 2016). Selain itu, ekstrak kemenyan yang dilarutkan pada metanol dilaporkan tidak berefek toksik dengan nilai  $LD_{50} > 1$  g/L terhadap spesies *Artemia* (Biggs *et al.*, 2016). *Styrax benzoin* yang diekstrak sebagai sintesis *silver nanoparticle* menjadi AgNPs memiliki efek sitotoksik yang rendah dan bekerja baik terhadap sel keratin manusia (Du *et al.*, 2016). Lebih lanjut, asam sinamat yang merupakan komposisi tertinggi dari kemenyan sebesar 19% dan merupakan zat aktif dari kemenyan juga tidak berefek toksik terhadap manusia (Burger *et al.*, 2016; Sova, 2012). Asam sinamat dan derivatnya juga memiliki toksisitas yang rendah. Kedua senyawa ini tidak memiliki efek toksik terhadap *Human Umbilical Vein Endothelial Cell* (Guzman, 2014; Kanaani & Ginsburg, 1992). Selain asam sinamat, kandungan fenolat yang memiliki aktivitas antioksidan pada kemenyan juga berefek toksik rendah dan mudah dimetabolisme oleh tubuh jika dikonsumsi secara oral (Ou *et al.*, 2004).

Kemenyan Toba yang tidak toksik berpotensi digunakan sebagai kandidat bahan baku dalam pengembangan obat berbahan dasar alam. Kemenyan bersifat tidak toksik disebabkan komposisi penyusun dan bahan aktifnya seperti asam

sinamat, derivat asam sinamat, senyawa fenolat, dan flavonoid juga bersifat tidak toksik meskipun belum sepenuhnya diketahui kandungan utamanya.

Keterbatasan dalam penelitian ini adalah belum dapat membandingkan secara pasti tingtur etanol dengan metanol yang digunakan sebagai pelarut sehingga hasil yang diperoleh berbeda dengan penelitian Hidayat (2018). Lingkup penelitian efek farmakologis yang dilakukan dalam penelitian ini juga terbatas. Penulis merekomendasikan penelitian lanjutan berupa konfirmasi hasil penelitian ini dan membandingkan aktivitas antioksidan antar kedua pelarut kemenyan tersebut.





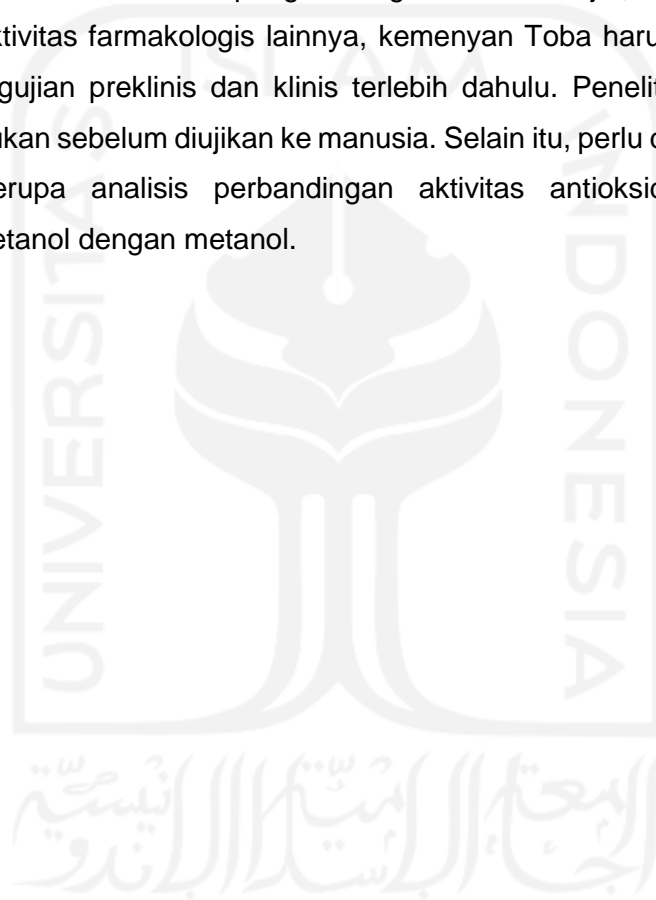
## BAB V. SIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Simpulan

1. Tingtur kemenyan Toba memiliki aktivitas antioksidan yang sangat rendah dalam uji antioksidan menggunakan DPPH dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 33,7 g/L.
2. Tingtur kemenyan Toba bersifat tidak toksik terhadap BSLT, ditandai dengan nilai  $LC_{50}$  sebesar 8,006 g/L.

### 5.2 Saran

Sebelum dilakukan pengembangan lebih lanjut, termasuk menguji berbagai aktivitas farmakologis lainnya, kemenyan Toba harus melalui berbagai proses pengujian preklinis dan klinis terlebih dahulu. Penelitian secara *in vivo* harus dilakukan sebelum diujikan ke manusia. Selain itu, perlu dilakukan penelitian lanjutan berupa analisis perbandingan aktivitas antioksidan antar pelarut kemenyan etanol dengan metanol.



## DAFTAR PUSTAKA

- Aslanturk, O. S. (2016). In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. *Intech*, 13. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>
- Biggs, I., Sirdarta, J., White, A., & Edwin Cock, I. (2016). GC-MS Analysis of Frankincense Extracts which Inhibit the Growth of Bacterial Triggers of Selected Autoimmune Diseases. *Pharmacognosy Communications*, 6(1), 10–22. <https://doi.org/10.5530/pc.2016.1.3>
- BPS Sumatera Utara. (2010). *Sumatera Utara dalam Angka*. Badan Pusat Statistik Provinsi Sumatera Utara.
- Brody, T. (2018). Drug–Drug Interactions: Part One (Small Molecule Drugs). In *FDA's Drug Review Process and the Package Label*. Elsevier Ltd. <https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/ic50>
- Burger, P., Casale, A., Kerdudo, A., Michel, T., Laville, R., Chagnaud, F., & Fernandez, X. (2016). New insights in the chemical composition of benzoin balsams. *Food Chemistry*, 210, 613–622. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.015>
- Camarda, L., Di Stefano, V., & Pitonzo, R. (2011). Natural resins: Chemical constituents and medicinal uses. *Resin Composites: Properties, Production and Applications, January*, 353–374.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1965). *Farmakope Indonesia vol. 2* (1st ed.).
- Dewoto, H. R. (2007). Pengembangan Obat Tradisional Indonesia Menjadi Fitofarmaka. *Maj. Kedokteran Indonesia*, 57(7), 205–211.
- Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & Ju, Y. H. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(3), 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.11.001>
- Du, J., & Singh, H. (2016). Antibacterial , anti-biofilm and anticancer potentials of green synthesized silver nanoparticles using benzoin gum ( *Styrax benzoin* ) extract. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. <https://doi.org/10.1007/s00449-016-1666-x>
- Elhardallou, S. B. (2011). Cytotoxicity and Biological Activity of Selected Sudanese Medicinal Plants. *Research Journal of Medicinal Plant*, 5(3), 201–229.
- Fraunberger, E. A., Scola, G., Laliberté, V. L. M., Duong, A., & Andrezza, A. C. (2016). Redox Modulations, Antioxidants, and Neuropsychiatric Disorders. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1155/2016/4729192>
- Guzman, J. D. (2014). *Natural Cinnamic Acids, Synthetic Derivatives and Hybrids with Antimicrobial Activity*. <https://doi.org/10.3390/molecules191219292>

- Harikrishnan, R., Kim, J. S., Kim, M. C., Balasundaram, C., & Heo, M. S. (2011). *Styrax japonica* supplementation diet enhances the innate immune response in *Epinephelus bruneus* against bacterial and protozoan infections. *Experimental Parasitology*, 129(3), 260–265. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.07.017>
- Hayes, W., Wang, T., Dixon, D., & Loomis, T. (2019). *Loomis's Essentials of Toxicology* (5th ed.). Elsevier.
- Hidayat, A., Iswanto, A., Susilowati, A., & Rachmat, H. (2018). Radical Scavenging Activity of Kemenyan Resin Produced by an Indonesian Native Plant, *Styrax sumatrana*. *J. Korean Wood Sci. Technol.*, 46(5), 0–2. <https://doi.org/10.5658/WOOD.2018.46.4.346>
- Humco Holding Group, I. (2017). *Benzoin Compound Tincture - benzoin resin liquid*. DailyMed. <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/fda/fdaDrugXsl.cfm?setid=a893a232-2ea8-4e0d-8cbf-7f5040b3be2e&type=display>
- Ibrahim, S., & Glasg, F. (2016). *Tincture of Benzoin to Prevent Cast Slippage in Clubfoot*. 10(3), 62–63.
- Jadid, N., Hidayati, D., Hartanti, S. R., Arraniry, B. A., Rachman, R. Y., & Wikanta, W. (2017). Antioxidant activities of different solvent extracts of *Piper retrofractum* Vahl. using DPPH assay. *AIP Conference Proceedings*, 1854(June). <https://doi.org/10.1063/1.4985410>
- Jaradat, N., Al-Masri, M., Zaid, A. N., Hussein, F., Shadid, K. A., Al-Rimawi, F., Shayeb, K., Sbeih, A., & Eid, A. (2018). Assessment of the antimicrobial and free radical scavenging activities of *Moluccella spinosa*, *Helichrysum sanguineum*, and *Styrax officinalis* folkloric medicinal plants from Palestine. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 18(2), 107–114. <https://doi.org/10.1007/s13596-018-0316-z>
- Jayusman. (2014). *Mengenai Pohon Kemenyan (Styrax spp.) Jenis dengan Spektrum Pemanfaatan Luas yang Belum Dioptimalkan* (1st ed.). IPB Press. [http://www.forda-mof.org/files/buku\\_14\\_kemenyan.pdf](http://www.forda-mof.org/files/buku_14_kemenyan.pdf)
- Kanaani, J., & Ginsburg, H. (1992). *Effects of Cinnamic Acid Derivatives on In Vitro Growth of Plasmodium falciparum and on the Permeability of the Membrane of Malaria-Infected Erythrocytes*. 36(5), 1102–1108.
- Katz, E., Goloubinoff, M., Perez, M., & Michon, G. (1997). Experiences in Benzoin Resin Production in Sumatra, Indonesia. *Conservation, Management and Utilisation Of Plant Gums, Resins And Essential Oils: Proceedings of a Regional Conference for Africa*, 56–66.
- Korosec, B., Sova, M., Turk, S., & Kras, N. (2013). *Antifungal activity of cinnamic acid derivatives involves inhibition of benzoate 4-hydroxylase (CYP53)*. 955–966. <https://doi.org/10.1111/jam.12417>
- Lachenmeier, D. W. (2008). Safety evaluation of topical applications of ethanol on the skin and inside the oral cavity. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 3(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1745-6673-3-26>
- Lembaga Penelitian Kimia Hasil Hutan. (1970). *Chemical Analysis of Benzoin Sumatra* (1st ed.). Lembaga Penelitian Kimia Hasil Hutan.

- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). *Free radicals , antioxidants and functional foods : Impact on human health*. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- Lü, J., Lin, P. H., Yao, Q., & Chen, C. (2010). *Chemical and molecular mechanisms of antioxidants : experimental approaches and model systems*. 14(4), 840–860. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x>
- Lusiana. (2019). *Aktivitas Antioksidan dan Kandungan Senyawa Dugaan pada Ekstrak Kemenyan (Styrax benzoin)*. Institut Pertanian Bogor.
- Mihir, P., & Butala, U. (2016). Use of Tincture Benzoin Seal in post operative wound cover. *Indian Journal of Applied Basic Medical Sciences*, 18b(27). <http://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:ijabms&volume=18b&issue=27&article=007>
- Mirzaei, A., Mirzaei, N., & Ghavamizedh, M. (2013). Antioxidant Activity and Cytotoxicity of *Dorema aucheri* by *Artemia urmiana*: a Brine Shrimp Lethality Test. *Life Science Journal*, 10(12s), 8–12.
- Molyneux, P., & Associates, M. (2003). The use of the stable radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, 26(2), 211–219. <https://www.researchgate.net/publication/237620105>
- Muaja, A. D., Koleangan, H. S. J., & Runtuwene, M. R. J. (2013). *Uji Toksisitas dengan Metode BSLT dan Analisis Kandungan Fitokimia Ekstrak Daun Soyogik (Saurauia bracteosa DC) dengan Metode Soxhletasi*. 2(2), 115–118.
- National Center for Biotechnology Information. (2020). *PubChem Compound Summary for CID 444539, Cinnamic acid*. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cinnamic-acid>
- Noni, F. W. (2017). *Filogenetika Kemenyan Toba (Styrax sumatrana) Berdasarkan Sekuen DNA Kloroplas trnL-trnF* [Universitas Sumatera Utara]. <http://repository.usu.ac.id/handle/123456789/66426>
- Oliveira, P. F., Damasceno, J. L., Bertanha, C. S., Araújo, A. R. B., Pauletti, P. M., & Tavares, D. C. (2016). Study of the cytotoxic activity of *Styrax camporum* extract and its chemical markers, egonol and homoegonol. *Cytotechnology*, 68(4), 1597–1602. <https://doi.org/10.1007/s10616-015-9864-y>
- Ou, S., & Kwok, K. C. (2004). Ferulic acid: Pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(11), 1261–1269. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1873>
- Pasaribu, G., Jasni, J., Damayanti, R., & Wibowo, S. (2013). Sifat Anatomi, Sifat Fisis dan Mekanis pada Kayu Kemenyan Toba (*Styrax sumatrana*) dan Kemenyan Bulu (*Styrax paralleloneurus*). *Jurnal Penelitian Hasil Hutan*, 31(2), 161–169. <https://doi.org/10.20886/jphh.2013.31.2.161-169>
- Pauletti, P. M., Teles, H. L., Silva, D. H. S., Araújo, Â. R., & Bolzani, V. S. (2006). The Styracaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16(4), 576–590. <https://doi.org/10.1590/s0102-695x2006000400023>
- Rahmawati, D. (2012). *Aktivitas antiinflamasi senyawa asam sinamat dari kemenyan pada tikus galur*.

- Ridho, E. (2013). *Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Buah Lakum (Cayratia trifolia) dengan Metode DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil)*. Universitas Tanjungpura.
- Sarah, Q. S., Anny, F. C., & Misbahuddin, M. (2017). Brine shrimp lethality assay. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 12(2), 186–189. <https://doi.org/10.3329/bjp.v12i2.32796>
- Sari, N. (2016). Berbagai Tanaman Rempah Sebagai Sumber Antioksidan Alami. *Elkawnie: Journal of Islamic Science and Technology*, 2(2), 203–212.
- Satria, M. (2013). *Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak n-Heksan Buah Lakum (Cayratia trifolia) dengan Metode DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil)*. Universitas Tanjungpura.
- Scheuba, J., Wronski, V., Rollinger, J. M., & Grienke, U. (2017). *Fast and Green – CO<sub>2</sub> Based Extraction, Isolation, and Quantification of Phenolic Styrox Constituents* \* Authors. 1068–1075.
- Seck, R. (2019). Synthesis and Antimalarial Activity of Cinnamic Acid Derivatives. *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, March.
- Shekhar, T. C., & Anju, G. (2014). Antioxidant Activity by DPPH Radical Scavenging Method of *Ageratum conyzoides* Linn. Leaves. *American Journal of Ethnomedicine*, 1, 244–249. [https://doi.org/10.1016/S0029-5493\(01\)00385-5](https://doi.org/10.1016/S0029-5493(01)00385-5)
- Siregar, Y. S. (2018). *Analisis Kimia Kayu Kemenyan Toba (Styrax sumatrana) Berdasarkan Tempat Tumbuh dan Posisi Dalam Batang* [Universitas Sumatera Utara]. <http://repositori.usu.ac.id/bitstream/handle/123456789/3279/141201117.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Sirivibulkovit, K., Nouanthavong, S., & Sameenoi, Y. (2018). Paper-based DPPH assay for antioxidant activity analysis. *Analytical Sciences*, 34(7), 795–800. <https://doi.org/10.2116/analsci.18P014>
- Sitompul, M. (2011). *Kajian Pengelolaan Hutan Kemenyan (Styrax sp.) di Kabupaten Humbang Hasundutan, Provinsi Sumatera Utara*. Institut Pertanian Bogor.
- Sova, M. (2012). *Antioxidant and Antimicrobial Activities of Cinnamic Acid Derivatives*. 749–767.
- Susilowati, A., Kholibrina, C. R., Rachmat, H. H., & Munthe, M. A. (2018). Phylogeny of kemenyan (*Styrax* sp.) from North Sumatra based on morphological characters. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 122(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/122/1/012062>
- Suzery, M., & Cahyono, B. (2014). Evaluation of Cytotoxicity Effect of *Hyptis pectinata* Poit (Lamiaceae) extracts using BSLT and MTT methods. *Jurnal Sains Dan Matematika*, 22(3), 84-88–88.
- Tristantini, D., Ismawati, A., Pradana, B. T., & Gabriel, J. (2016). Pengujian Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH pada Daun Tanjung (*Mimusops elengi* L.). *Universitas Indonesia*, 2.

- Wahyu Ningdyah, A., Hairil Alimuddin, A., & Jayuska, A. (2015). Uji Toksisitas Dengan Metode BSLT (Brine Shrimp Lethality Test) Terhadap Hasil Fraksinasi Ekstrak Kulit Buah Tampoi (*Baccaurea macrocarpa*). *JKK*, 4(1), 75–83.
- Zofou, D., Tene, M., Tane, P., & Titanji, V. P. K. (2012). *Antimalarial drug interactions of compounds isolated from Kigelia africana ( Bignoniaceae ) and their synergism with artemether , against the multidrug-resistant W2mef Plasmodium falciparum strain*. 539–544. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2519-9>



## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Surat Kelayakan Etik



MEDICAL AND HEALTH RESEARCH ETHICS COMMITTEE (MHREC)  
FACULTY OF MEDICINE, PUBLIC HEALTH AND NURSING  
UNIVERSITAS GADJAH MADA – DR. SARDJITO GENERAL HOSPITAL



ETHICS COMMITTEE  
Exemption Letter

Ref. No. : KE/FK/1480 /EC/2019

Title of the Research Protocol : Uji Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Tingtur Kemenyan Toba (*Styrax Paralleoneurus*): Studi Pendahuluan

Document(s) and version : Study Protocol version 01 2019

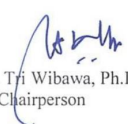
Principle Investigator : Reza Ishak Estiko


Participating investigator : Dr. dr. Isnatin Miladiyah, M.Kes.

Institution(s)/place(s) of research : 1. Laboratorium Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam dan Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Indonesia (UII)  
2. Laboratorium Farmakognosi, Program Studi/Departemen Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gajah Mada (UGM)

The Medical and Health Research Ethics Committee (MHREC) states that the document(s) above meet The Office for Human Research Protections (OHRP) under the requirements of the U.S. Department of Health and Human Services (HHS) regulations at 45 CFR part 46 for **exempt review**.

Yogyakarta, 19 DEC 2019

  
Prof. dr. Tji Wibawa, Ph.D., Sp.MK(K).  
Panel's Chairperson

  
dr. Yana Supriatna, Sp.Rad(K), Ph.D.  
Panel's Secretary