

5. PEMBAHASAN

Berdasarkan dari beberapa pengujian yang didapat mengenai toksisitas kelima senyawa flavor, dapat diulas lebih jelas sebagai berikut:

5.1. Vanillin

Vanillin merupakan senyawa kimia yang memiliki ciri mampu memberikan aroma dan rasa dari tanaman vanilla. Senyawa ini biasanya digunakan sebagai zat penyedap yang banyak digunakan dalam produk pangan seperti berbagai makanan maupun minuman, selain itu juga digunakan sebagai zat pencegah tidur, pengharum/ wewangian dan juga digunakan dalam bidang farmasi (Bythrow, 2005). Diantara berbagai macam flavor yang digunakan dalam produk pangan, penggunaan flavor vanilla menempati posisi pertama di pasar dan penggunaannya biasanya ditemukan pada produk pangan seperti *ice cream*, susu, minuman, roti dan coklat. Pada flavor vanilla memiliki aroma dan rasa yang khas, yang biasanya disebabkan oleh ekstrak vanilla. Senyawa flavor vanillin merupakan komponen utama yang khas yang mampu memberikan aroma dan rasa pada vanilla (Sinha *et al.*, 2008).

Vanillin ini sendiri memiliki beberapa sifat biologis yang menguntungkan, beberapa diantaranya adalah memiliki sifat anti mikroba yang cukup kuat. Berdasarkan penelitian Fitzgerald *et al.*, (2003) menyatakan bahwa sifat antimikroba vanillin mampu menghambat pertumbuhan 3 jenis khamir yang terdapat dalam makanan yang mampu menyebabkan pembusukan pada makanan. Selain itu vanillin juga memiliki kemampuan yaitu mampu mencegah dan mengobati kanker yang berkaitan dengan mutasi (Ketli *et al.*, 2009). Perlu digaris bawahi bahwa kemampuan vanillin dalam mencegah kanker apabila dikonsumsi dalam kondisi tidak teroksidasi di saluran pencernaan (Sammons & Williams, 1941). Walaupun vanillin dinyatakan aman, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek toksik vanillin dalam bentuk tidak teroksidasi, dikarenakan penggunaannya yang cukup luas dalam industri pangan (Ho *et al.*, 2011).

Berdasarkan pada Tabel 2. dapat dilihat bahwa terdapat berbagai macam penelitian mengenai toksisitas senyawa flavor vanillin yang dilakukan secara *in vivo* dengan pemberian secara oral. Berdasarkan dari penelitian tersebut efek toksisitas senyawa flavor vanillin dapat dibandingkan berdasarkan jenis toksisitasnya.

Pada Tabel 2. terdapat 2 kelompok penelitian mengenai efek toksik dari vanillin yaitu penelitian toksisitas akut dan sub kronis. Pada penelitian sub kronis dapat dilihat bahwa dosis yang digunakan oleh Ho *et al* (2010) dan Matsushita *et al* (2019) memiliki rentang dosis yang hampir sama, berbeda dengan penelitian Deichman *et al.*, (1940) menggunakan dosis yang jauh lebih rendah namun waktu yang digunakan lebih lama. Dari ketiga penelitian tersebut memiliki efek yang hampir sama. Pada penelitian Ho *et al.*, (2010) dan Matsushita *et al* (2019) memiliki efek yaitu terjadinya peningkatan berat badan namun hanya sedikit. Pada dosis 1000 mg/kg berat badan terjadi penurunan bobot hati, ginjal dengan jumlah yang sangat sedikit. Selain itu pada dosis tersebut pada pemeriksaan histopatologis diamati bahwa terdapat hipertrofi hepatoseluler di hati. Dalam penelitian Deichman *et al.*, (1940) juga menyatakan apabila konsumsi vanillin dalam dosis yang lebih tinggi dapat memberikan efek bagi tubuh yaitu perubahan histopatologis yang memiliki beragam tingkat keparahan baik pada miokardium, ginjal, hati, paru-paru, limpa dan perut pada hewan uji tikus dan kelinci. Hal itu dikarenakan pada organ hati merupakan salah satu organ utama yang memiliki peran sebagai metabolisme senyawa, obat-obatan dan bahan kimia (Malaguarnera *et al.*, 20012). Hipertrofi hati ini merupakan salah satu penanda yang cukup jelas apabila tubuh mengalami beberapa masalah kesehatan, yang biasanya diakibatkan oleh beberapa faktor yang berhubungan dengan peradangan pada hati atau penyakit lain yang dapat mempengaruhi fungsi hati (Meutia, 2018). Selain hati, ginjal juga rentan mengalami kerusakan, hal itu dikarenakan sekitar 20-25% curah jantung, kemampuan ginjal dalam menyaring darah yaitu sekitar 60 kali dalam 1 hari, sehingga ginjal memiliki peran yang lebih penting dibandingkan hati dalam aspek mengeliminasi toksik.

Produk metabolisme apabila tidak dibutuhkan oleh tubuh maka akan di keluarkan melalui amonia, urea, asam urat dan keratin, selain itu terdapat pula produk akhir dari metabolisme yaitu berupa hemoglobin dan metabolit hormon. Apabila suatu senyawa tidak dapat diekskresikan menjadi urin maka efeknya akan menumpuk diginjal dan apabila terjadi terus menerus maka akan menyebabkan terjadinya kerusakan pada ginjal (Pizzorno, 2015).

Selain itu pada penelitian Ho *et al* (2010) juga menyatakan bahwa tidak terjadi perubahan pada fungsi organ pada hati dan ginjal. Pada pemberian dosis 150 dan 300 mg vanillin /kg berat badan dilakukan pemeriksaan GGT dan dihasilkan kadar yang rendah. *Gamma-glutamyl transferase* (GGT) tersebut adalah suatu enzim yang dihasilkan oleh organ hati namun juga dihasilkan oleh organ lain seperti ginjal, pankreas, jantung dan otak. Tujuan dari pemeriksaan GGT yaitu untuk mengetahui adanya gangguan fungsi hati. Selain itu GGT memiliki peran yang penting pada hati sebagai metabolisme obat-obatan maupun berbagai zat yang berpotensi beracun. Meskipun kadar GGT yang didapatkan pada perlakuan vanillin (150 dan 300 mg/kg vanillin) + alkohol lebih rendah yaitu berkisar 8,37 IU/L-9,89 IU/L dibandingkan dengan kadar GGT dengan perlakuan etanol saja yaitu 12,96 IU/L, namun masih dianggap normal dan tidak menimbulkan masalah kesehatan ataupun berbahaya bagi hati. Hal itu dikarenakan kadar normal pada GGT yaitu sekitar 0-51 IU/L (Solar & Mewo, 2021). Selain itu pada dosis tersebut juga tidak memiliki efek dalam kerusakan DNA dan gen peradangan pada otak hewan uji. Sedangkan pada penelitian Deichman *et al.*, (1940) dengan dosis yang lebih rendah yaitu 20 dan 64 mg/kg berat badan dengan waktu yang lebih lama juga menyatakan bahwa senyawa vanillin tidak memiliki potensi berbahaya bagi tubuh. Senyawa vanillin ini mampu menyebabkan efek keracunan yang fatal, hal itu karena senyawa ini relatif tidak dapat larut dalam air dingin atau pada susu yang dingin, sehingga mampu menimbulkan rasa pahit dari ekstrak pekat yang mampu menyebabkan keracunan tersebut.

Pada penelitian toksisitas akut yang dilakukan oleh Chen *et al* (2012) untuk mengetahui efek dari vanillin dengan pemberian oral selama 7 hari dengan dosis yang digunakan cukup rendah yaitu 3, 15 dan 75 mg/kg berat badan dalam sehari (*in vivo*) dan 8 dan 128 mg/kg (*in vitro*). Pada penelitian ini dilakukan dengan maksud untuk mengetahui dampak vanillin terhadap aktivitas enzim CYP baik secara *in vivo* maupun *in vitro*. Enzim sitokrom P450 (CYP) itu sendiri merupakan enzim yang memiliki peran yang penting dalam tubuh manusia sebagai metabolisme obat-obatan, xenobiotik dan senyawa endogen baik pada hewan maupun manusia (Yusmiati & Muliaty., 2014). Sitokrom P450 (CYP) terdiri dari beberapa enzim yaitu CYP2C9, CYP2E1, CYP3A4, CYP2B6 dan CYP1A2. Pada tubuh manusia yaitu mikrosom hati maupun isoform P450 (CYP2C9, CYP2E1, CYP3A4, CYP2B6 dan CYP1A2) digunakan sebagai sistem uji yang paling banyak digunakan untuk mengetahui interaksi obat-obat dan senyawa kimia yang masuk dalam tubuh (DDI) (Bjornsson *et al.*, 2003). Pada tikus juga terdapat isoform CYP (CYP1A2, CYP2C, CYP3A, dan CYP2E1) yang memiliki kemiripan dengan isoform CYP pada manusia. Selain pada manusia, tikus juga biasanya digunakan untuk mengetahui DDI manusia yang berhubungan dengan penghambatan aktivitas CYP (Bogaards *et al.*, 2000).

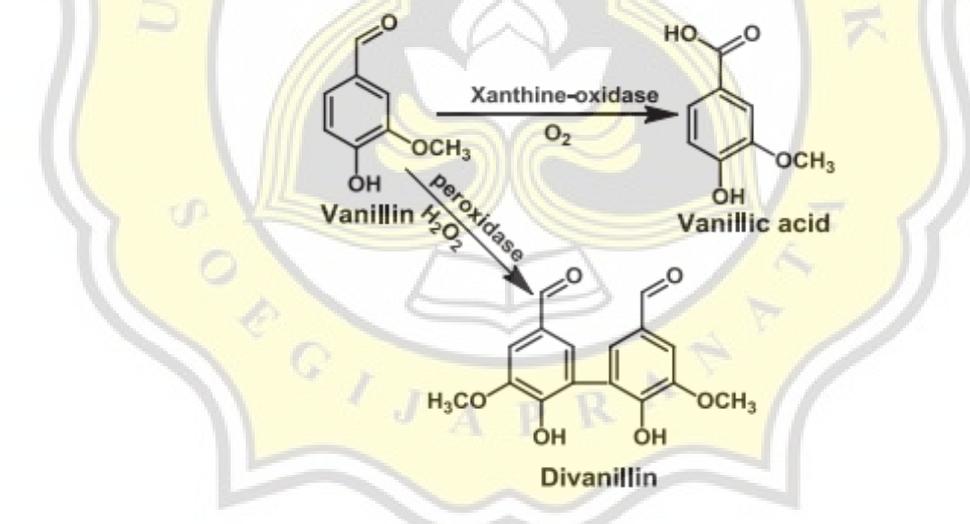
Pada penelitian *in vitro* pemberian vanillin dengan dosis tersebut tidak berpengaruh terhadap enzim P450 yang terdiri dari CYP1A2, 3A4, 2B6, 2C9, 2E1. Pada penelitian secara *in vivo* memiliki efek yang berbeda dengan penelitian secara *in vitro*. Pemberian vanillin selama 7 hari mampu menginduksi atau menghambat enzim CYP2E1 dan CYP1A2. Berdasarkan teori Guengerich (2006) menyatakan bahwa penghambatan CYP yang berkaitan dengan interaksi senyawa maupun obat, telah terbukti mampu menyebabkan efek negatif bagi manusia. Chen *et al* (2012) juga menyatakan bahwa aktivitas metabolik karsinogen juga dapat di mediasi oleh CYP2E1 dan CYP1A2. Penghambatan kedua enzim tersebut menyebabkan terjadinya penurunan aktivitas CYP2E1 dan CYP1A2 sehingga memberikan efek yang dapat menghambat

biotransformasi bahan kimia di hati, selain itu juga dapat melemahkan karsinogen maupun cedera hati yang disebabkan oleh bahan kimia tersebut (Gonzalez, 2005; Yao *et al.*, 2009). Sehingga dapat dikatakan bahwa DDI bahan tambahan makanan vanillin dan obat yang mampu memetabolisme kedua enzim tersebut bisa saja terjadi. Oleh karena itu penggunaan vanillin juga perlu diperhatikan dalam industri makanan, hal itu tujuannya untuk menghindari adanya interaksi yang dapat merugikan (Chen *et al.*, 2012). Selain itu ECHA (2008) melaporkan bahwa vanillin memiliki nilai LD₅₀ (tikus) yaitu sekitar 3.978 mg/kg berat badan per hari. Sehingga dapat dikatakan vanillin memiliki level toksisitas yang rendah berdasarkan dari beberapa penelitian yang telah dilakukan. Asupan harian vanillin di Eropa dan Amerika Serikat, sekitar 0,9 dan 2,5 mg/kg bb, tidak melebihi ADI 0–10 mg/kg bb untuk vanilin. Penggunaan vanillin dalam produk pangan tidak menunjukkan adanya masalah keamanan apabila mengonsumsi pada tingkat asupan harian saat ini (JECFA, 2008).

Vanillin mampu memberikan efek peningkatan berat badan pada hewan uji (tikus), hal itu dikarenakan vanillin secara signifikan mampu menyebabkan peningkatan dalam asupan makanan pada tikus. Berdasarkan pengujian *in vitro*, hal tersebut karena terjadinya aktivasi reseptor penciuman pada tikus mOR-EG (Kajiya *et al.*, 2001). Namun belum dipastikan reseptor penciuman yang berhubungan dengan meningkatnya efek nafsu makan pada tikus (Ogawa *et al.*, 2018). Terjadinya peningkatan nafsu makan pada tikus diikuti dengan kurva dosis respon yang berbentuk lonceng yang berkaitan dengan tingkat ekspresi mRNA neuropeptida Y dan pro-opiomelanocortin (POMC) di hipotalamus (Ogawa, 2016) yang memiliki peran dalam mengontrol nafsu makan (Schwartz *et al.*, 2000). Namun apabila mengonsumsi dalam dosis yang cukup tinggi, POMC dapat memberikan respon dalam penurunan asupan makanan (Choi *et al.*, 2011).

Vanillin mampu mengalami oksidasi pada saluran pencernaan, dan produk dari oksidasi vanillin adalah asam vanilat (Sammons dan Williams, 1941). Selain itu oksidasi vanillin juga terjadi akibat dari reaksi dengan oksigen dalam larutan

basa dan reaksi pada suhu yang tinggi yaitu $<100\text{ }^{\circ}\text{C}$, serta ketika berada dalam kondisi basa yang tinggi (Weerawatanakorn *et al.*, 2015). Oksidasi vanillin juga tergantung pada pH, serta konsentrasi oksigen juga berhubungan terhadap laju oksidasi vanillin yang berada pada pH yang tinggi (>12), namun tidak berhubungan pada pH yang rendah (<12) (Wallick & Sarkanen, 1983). Berdasarkan pada penelitian Anklam *et al* (1997) mengenai oksidasi vanillin pada produk susu, vanillin juga mampu mengalami oksidasi yang diakibatkan oleh enzim susu seperti peroksidase dan xanthine oksidase, serta produk oksidasi yang dihasilkan ada 2 yaitu divanillin dan asam vanilat. Sementara produk oksidasi divanillin diperoleh dari adanya peroksidase dan hidrogen peroksida. Pembentukan asam vanilat tersebut terjadi pada susu segar dan pasteurisasi yang biasanya disebabkan oleh enzim susu itu sendiri yaitu xantin oksidase. Sedangkan pada produk susu lain seperti krim dan mentega, pada penelitian Anklam *et al* (1997) vanillin terbukti stabil.



Gambar 7. Oksidasi enzimatik vanillin (Anklam *et al.*, 1997).

Vanillin mampu mengalami oksidasi pada susu, oleh karena itu asam vanilat perlu diperhatikan potensi toksisitasnya apabila dikonsumsi dalam tubuh.

Pada penelitian Mirza dan Panchal (2020) mengenai toksisitas subakut asam vanilat secara *in vivo* dengan dosis yang digunakan yaitu 1000 mg/kg/ hari . Penggunaan dosis tersebut dilakukan karena tidak adanya kematian hewan uji. Pada penelitian diamati beberapa hal yaitu tanda-tanda toksik, kematian, berat

badan, semua estimasi hematologi dan biokimia dalam darah dan histopatologi organ internal vital. Asam vanilat dengan dosis 1000 mg/kg/hari tidak menunjukkan tanda-tanda toksik dan tidak adanya kematian yang tercatat pada saat penelitian, namun terjadi kenaikan berat badan dan berat organ yang diamati. Selain itu juga di evaluasi elektrolit (K, Na, P, dan Ca) dalam serum. Elektrolit adalah salah satu hal yang penting dalam mendukung segala aktivitas sel tubuh dan jaringan yang ada di dalam tubuh baik saraf maupun otot. Selain itu peran elektrolit juga sebagai menjaga fungsi jantung maupun cairan dalam tubuh agar seimbang. Namun terjadi penurunan yang signifikan dalam Na pada tikus jantan yang diberi perlakuan. Sedangkan Natrium merupakan kation utama yang digunakan untuk menjaga keseimbangan elektrolit dan cairan tubuh (Azizah & Aliviameita, 2019). Penurunan Na tersebut bisa saja terjadi karena peningkatan kehilangan urin dan juga penurunan Na yang dimediasi oleh hormon antidiuretik. Penurunan Na tersebut tidak menjadi masalah yang serius maupun tidak dianggap sebagai efek toksik yang utama. Hal itu karena penurunan Na tidak menyebabkan perubahan yang besar pada tingkat elektrolit yang lain yaitu K, P dan Ca. Sehingga dapat dikatakan bahwa asam vanilat dapat dikatakan aman dan tidak memberikan efek toksik pada hewan uji (Mirza & Panchal, 2020).

Sebelumnya telah dijelaskan bahwa ekstrak dari vanilla merupakan salah satu penyedap yang paling banyak digunakan dalam makanan maupun minuman. Terjadi peningkatan penekanan yang dilakukan konsumen terhadap keinginan pada makanan yang mengandung bahan makanan “alami” dan berhubungan dengan produksi ekstrak vanilla (Hallagan & Joana, 2018). Tingginya biaya pembuatan ekstrak vanilla asli dan juga tingginya harga kacang vanilla, produsen sering menggunakan perasa vanilla buatan yang didalamnya terkandung vanillin dan etil vanillin yang diproduksi secara sintetis.

Mengonsumsi produk pangan yang menggunakan senyawa flavor vanillin dalam jangka waktu yang lama mampu memberikan dampak bagi kesehatan

tubuh. Vanillin tergolong dalam senyawa fenolik aldehid, berdasarkan Kyselova (2011) menyatakan penggunaan senyawa fenolik dalam konsentrasi yang cukup tinggi dan dalam paparan yang cukup panjang dapat mengakibatkan terjadinya kematian sel nekrosis pada hati. Selain itu pada beberapa produk pangan seperti susu kemasan sering dijumpai penggunaan perisa sintetik vanilla, pada penelitian yang dilakukan oleh Sales *et al* (2017) pada beberapa flavor seperti vanilla, coklat dan tutti frutti, dinyatakan bahwa perisa sintetik memiliki aktivitas sitotoksik dan genotoksik. Sedangkan adanya aktivitas sitotoksik dan mutagenik yang berasal dari agen genotoksik dapat memberikan efek toksisitas bagi tubuh apabila terpapar dalam waktu yang cukup lama dan terakumulasi di dalam tubuh seperti terjadinya perkembangan sel tumor (Almeida *et al.*, 2012). Paparan kronis vanillin juga dapat menimbulkan gangguan pada bagian gastrointestinal dan dapat menimbulkan keracunan fatal karena vanillin tidak mampu larut pada susu dingin yang menyebabkan keracunan karena rasa pahit yang dihasilkan oleh ekstrak vanilla yang pekat (Sales *et al.*, 2017). Oleh karena itu El-Wahab & Moram (2013) menyarankan bahwa konsumen perlu membatasi konsumsi perisa makanan yang sintetik terutama pada produk pangan yang dikonsumsi oleh anak-anak. Selain itu efek kesehatan lain yang dapat ditimbulkan oleh senyawa vanillin adalah mampu menyebabkan reaksi alergi pada beberapa orang, walaupun hal tersebut jarang ditemukan namun hal tersebut dapat terjadi pada anak-anak (Żukiewicz-Sobczak *et al.*, 2013). Beberapa gejala alergi yang ditimbulkan seperti pilek yang disebabkan oleh produksi histamin yang berlebihan, bibir bengkak dan mata berair (Żukiewicz-Sobczak *et al.*, 2013).

Berdasarkan dari data Tabel 2. didapat bahwa pada pemberian vanillin secara sub kronis mampu memberikan efek toksisitas pada organ ginjal dan hati. Hal itu dikarenakan vanillin memiliki sifat yang larut dalam air (*National Center for Biotechnology Information*, 2022). Berdasarkan teori Pizzorno (2015) menyatakan bahwa ginjal memiliki peran dalam menjaga kesehatan serta memiliki peran yang penting dalam ekskresi racun, selain itu ginjal juga

dianggap sebagai organ kedua yang memiliki fungsi penting dalam eliminasi racun. Kedua organ tersebut melakukan perannya dengan membuang produk metabolisme yang tidak diinginkan melalui urin. Oleh karena itu baik hati maupun ginjal sering mengalami dampak yang diakibatkan oleh bahan kimia yang masuk ke dalam tubuh secara oral yang nantinya akan diserap oleh saluran pencernaan, kemudian akan diangkut ke hati (Eipel *et al.*, 2010). Senyawa kimia tersebut dapat menimbulkan efek toksisitas pada hati maupun ginjal, apabila memiliki sifat yang larut dalam air (Pizzo, 2015; Pizzorno, 2015). Meskipun kedua organ tersebut sangat efektif dalam menngeliminasi senyawa kimia yang berpotensi toksik, namun beberapa dari senyawa kimia sulit untuk dieksresikan melalui urin. Apabila hal tersebut terjadi mereka akan mengalami penumpukan pada organ ginjal dan apabila terpapar dalam jangka waktu yang lama mengakibatkan peningkatan konsentrasi dan dapat menyebabkan terjadinya kerusakan pada ginjal (Pizzorno, 2015).

5.2.Citral

Citral merupakan senyawa flavor yang penting untuk memberikan flavor lemon yang kuat, selain itu citral juga merupakan bahan aditif yang paling banyak digemari oleh konsumen selain vanillin dan penggunaannya yang cukup luas dalam industri pangan (Zhao *et al.*, 2013). Citral dapat diperoleh dari minyak jeruk maupun serai dan banyak digunakan dalam makanan, minuman dan wewangian. Penggunaan citral dalam produk pangan juga sangat luas seperti vanillin, berbagai macam penggunaannya yaitu dalam soft drinks, dessert, permen karet, es krim, dan juga makanan yang dipanggang (Opdye, 1979).

Karena penggunaannya yang cukup luas dalam industri pangan dan merupakan salah satu senyawa flavor yang paling digemari oleh konsumen, perlu diperhatikan efek toksik yang mampu diberikan oleh citral apabila di konsumsi dalam jumlah yang banyak maupun dalam jangka panjang dan pendek. Berdasarkan pada Tabel 3. dapat dilihat beberapa penelitian yang membahas mengenai toksisitas citral yang dilakukan secara *in vivo* yang terdiri dari toksisitas akut, sub kronis, dan kronis. Berdasarkan pada Tabel 3. tersebut

terdapat 2 penelitian toksisitas akut pada senyawa citral yaitu Waisindye (2016) dan Fandohan *et al* (2008).

Pada kedua penelitian tersebut dosis yang digunakan tidak jauh berbeda, namun pada penelitian Fandohan *et al* (2008) dosis yang digunakan hingga 3500 mg/kg berat badan. Dapat dilihat pada kedua penelitian tersebut, dosis 2000 mg/kg berat badan memberikan efek negatif pada tubuh hewan uji. Berdasarkan pada penelitian Waisindye (2016) terjadi kematian pada hewan uji pada pemberian dosis 750-2000 mg/kg berat badan dan terjadi kematian seluruh hewan uji pada pemberian dosis 2000 mg/kg berat badan terjadi kematian sebanyak 6 ekor. Hal itu juga dinyatakan dalam penelitian Fandohan *et al* (2008), pada pemberian dosis 2000 dan 3000 mg/kg berat badan terjadi kematian pada hewan uji pada hari ke dua. Selain itu pada pemeriksaan hitopatologi terjadi perubahan pada dinding lambung yang diberi dosis 3000 mg/kg berat badan. Perubahan signifikan pada dinding lambung menyebabkan hampir tidak dikenali. Pada bagian hati, terjadi penumpukan leukosit pada parenkim hati dan terdapat nekrosis hepatosit.

Nekrosis hepar adalah terjadinya kematian hepatosit yang merupakan bentuk dari efek toksik yang ditimbulkan dan termasuk bahaya namun tidak terlalu parah. Hal itu dikarenakan hati memiliki kemampuan dalam regenerasi yang sangat baik. Nekrosis hepar ini menyebabkan kerusakan pada bagian membran plasma dan mengakibatkan terjadinya kehancuran pada sel sehingga isi sel keluar dan akhirnya menghasilkan efek reaksi inflamasi (Meutia, 2018). Efek lain yang ditimbulkan citral pada hewan uji yang terdapat pada penelitian Noguera *et al* (1995) yang menyatakan bahwa pemberian citral dosis tinggi mampu menginduksi adanya toksisitas pada tikus hamil. Sehingga dapat dikatakan pada penelitian toksisitas akut, dosis >1000 mg/kg citral mampu memberikan efek toksik yang signifikan. Kemudian Waisindye (2016) menyatakan bahwa perlu dilakukannya penelitian toksisitas sub kronis dan kronis pada hewan uji terutama pada hewan tikus dan kelinci untuk mengetahui

potensi kemungkinan terjadinya efek toksik yang ditimbulkan apabila konsumsi citral secara oral pada manusia.

Berdasarkan pada Tabel 3. dapat dilihat bahwa pada penelitian Ress (2003), dilakukan penelitian toksisitas sub kronis dan kronis yang dilakukan secara oral pada hewan uji berupa tikus. Dosis yang digunakan pada penelitian sub kronis memiliki nilai yang lebih besar dari kronis. Pada penelitian sub kronis yang dilakukan selama 14 minggu menunjukkan bahwa target utama yang menjadi organ target akibat toksisitas citral adalah ginjal. Hal itu dikarenakan adanya nefropati dan gips granular tubulus ginjal pada dosis 3900 ppm, 7800 ppm dan 15000 ppm yang menyebabkan timbulnya nefropati α 2u-globulin. Berdasarkan teori Charbonneau *et al* (1987) menyatakan bahwa α 2u-globulin merupakan protein yang disintesis dalam tikus jantan. Namun α 2u-globulin tidak diamati pada manusia, sehingga adanya α 2u-globulin yang terdapat dalam lesi ginjal pada tikus jantan tidak dapat dianggap secara relevan sebagai penilaian resiko dalam tubuh manusia (Krieger, 2001). α 2u-globulin yang memiliki peran dalam toksisitas ginjal belum dapat dipastikan karena pada penelitian kronis yang dilakukan selama 2 tahun, menghasilkan tidak adanya peningkatan senyawa dalam neoplasma ginjal yang terdapat dalam tubuh tikus jantan. Sehingga Ress (2003) menyatakan bahwa tidak dimungkinkan α 2u-globulin memediasi lesi ginjal. Sedangkan pada penelitian yang dilakukan selama 2 tahun, efek yang ditimbulkan dalam pemberian citral adalah mampu memperburuk mineralisasi ginjal. Adanya efek lain yang belum dipastikan berkaitan dengan pemberian citral yaitu terjadinya peningkatan limfoma ganas pada tikus. Limfoma maligna itu sendiri merupakan sesuatu yang menyerang sel yang terdapat pada jaringan limfoid secara ganas dan biasanya ditemukan dan dideteksi pada bagian kelenjar getah bening maupun pada limpa, yang kemudiann dapat menyerang pada seluruh jaringan tubuh lain (Wibawa & Ekawati, 2020).

Selain vanillin, citral juga mampu mengalami degradasi oksidatif dan sangat sensitif terhadap siklisasi asam, terutama rentan terhadap adanya cahaya

maupun panas sehingga menghasilkan off-flavor pada beberapa produk yaitu produk jeruk dan jeruk nipis (Liang *et al.*, 2004). Proses degradasi dari citral dapat lebih cepat saat berada dalam kondisi asam, suhu yang tinggi, cahaya maupun adanya oksigen (Peacock & Kuneman, 1985). Produk off-flavor dari proses degradasi citral yaitu p-cymene, p-cresol, p-dimethylstyrene dan p-methylacetophenone (Zhao & Ho, 2013; Weerawatanakorn *et al.*, 2015). Pada penelitian Zhao & Ho (2013) citral mampu mengalami proses degradasi dan menghasilkan senyawa off-flavor yaitu pada suhu sekitar 25-45°C. Efek toksisitas dari beberapa produk degradasi citral juga perlu diamati. Berdasarkan teori *Agency for Toxic Substance & Disease Registry* (1992) menyatakan bahwa pemberian p-cresol dalam paparan akut mampu memberikan potensi efek toksik salah satunya yaitu mampu memberikan toksisitas pada hati. Selain itu Thompson *et al* (1994) juga melakukan penelitian mengenai efek dari p-cresol pada hewan uji berupa tikus dan menyatakan bahwa p-cresol mampu memberikan efek toksik pada hati tikus. P-cresol mampu memberikan efek toksik pada pemberian konsentrasi 0,25 µM selama 6 jam pemberian p-cresol sedangkan dalam pemberian konsentrasi 0,5 µM mampu memberikan peningkatan efek toksisitas yang signifikan selama waktu 4 jam. Toksisitas dari p-cresol bergantung pada kadar glutathione. Apabila kadar dari glutathione habis maka toksisitas dari p-cresol signifikan mengalami peningkatan, begitu juga sebaliknya apabila kadar glutathione meningkat maka toksisitas dari p-cresol signifikan menurun. Hal itu sesuai dengan teori Yuniastuti (2016) menyatakan bahwa glutathione (GSH) adalah antioksidan yang terdapat di tubuh hampir diseluruh jaringan mamalia yang utama terdapat dalam hati yang memiliki fungsi dalam melawan radikal bebas, sehingga apabila kadar GSH dalam tubuh mengalami penurunan maka terjadi peningkatan radikal bebas dalam tubuh dan menyebabkan terjadinya stress oksidatif yang berkaitan menyebabkan terjadinya suatu penyakit.

Citral sering ditambahkan dalam produk minuman kemasan, salah satunya adalah jus jeruk, dengan tujuan untuk meningkatkan flavor jeruk pada minuman

tersebut. Hal itu dikarenakan selama proses produksi, penyimpanan dan juga kemasan mampu mempengaruhi rasa yang dihasilkan, karena dapat dikatakan dalam pembuatan jus jeruk sangat mudah terjadi reaksi oksidasi. Selama proses pengolahan minuman, kontak dengan oksigen tidak dapat dihindari sehingga oksigen yang terdapat dalam jus jeruk akan merusak vitamin C dan nantinya dapat mempengaruhi flavor pada minuman tersebut (Perez-Cacho & Rouseff, 2018). Kehilangan flavor yang terjadi selama proses pengolahan, dapat diatasi dengan penambahan ekstrak jeruk dengan komponen utamanya adalah citral. Penggunaan citral dalam produk makanan maupun minuman juga dibatasi, dan ADI untuk citral itu sendiri sekitar 0,5 mg/kg yang telah ditetapkan oleh *Joint FAO/WHO Expert Committee Additives* (JECFA) (Hayes & Markovic, 2002). Sedangkan pada beberapa penelitian yang dilakukan dengan mendeteksi adanya citral produk pangan diperoleh data bahwa penggunaan citral melebihi batas ADI yang telah ditetapkan. Berdasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Strassburger *et al* (2010) pada beberapa sampel minuman yang mengandung citral, didapatkan bahwa terdapat 2 sampel minuman kemasan yang mengandung citral sebanyak 15 mg/kg. Selain itu pada penelitian lain yang dilakukan oleh Peacock & Kuneman (1985) menyatakan bahwa pada minuman berkarbonasi dideteksi adanya citral sebanyak 3 mg/kg. Penggunaan citral sebagai bahan penyedap termasuk dalam kelompok ADI sebesar 0-0,5 mg/kg bb untuk citral (JECFA, 2003). Dari kedua penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa penggunaan citral dalam produk minuman melebihi nilai ADI yang ditetapkan. *Acceptable daily intake* (ADI) itu sendiri didefinisikan sebagai batas aman asupan harian pada suatu zat yang dapat dikonsumsi oleh manusia untuk bahan tambahan makanan, sehingga secara hukum tidak boleh untuk dilampaui penggunaannya (Tomaska & Brooke, 2014). Apabila suatu senyawa tidak memiliki masalah keamanan maka suatu senyawa yang ditambahkan dalam produk pangan tidak membutuhkan nilai ADI. Pada beberapa penelitian yang ada pada beberapa produk minuman yang memiliki flavor jeruk didapatkan hasil bahwa kandungan citral yang terdapat didalamnya melebihi nilai ADI, mungkin saja memberikan efek kesehatan apabila

konsumen mengonsumsi dalam jumlah yang cukup banyak dan jangka yang panjang.

Efek toksik yang dihasilkan mungkin saja tidak hanya berasal dari citral yang ditambahkan melebihi nilai ADI, namun juga dapat dihasilkan dari interaksi senyawa toksik dari lingkungan dengan citral. Citral itu sendiri tergolong dalam senyawa aldehide tak jenuh, dan banyak aldehide yang menjadi kontaminan yang berasal dari pasokan air di Amerika Serikat, salah satunya adalah citral (Faroon *et al.*, 2008; Fujioka & Shibamoto, 2006; Werley *et al.*, 2008). Selain itu aldehide juga termasuk dalam komponen yang mudah meresap dan apabila sumber dari komponen tersebut berinteraksi dengan senyawa toksik yang berasal dari lingkungan maka resiko kesehatan pada paparan manusia harus menjadi perhatian (LoPachin & Gavin 2014). Mekanisme toksik yang berasal dari adanya paparan aldehide juga perlu di pahami, namun kurangnya pemahaman mengenai mekanisme tersebut dikarenakan banyaknya jenis dan struktur dari senyawa aldehide (O'Brien *et al.*, 2005).

Konsumsi citral jangka panjang yang ditambahkan dalam produk makanan menyebabkan beberapa efek kesehatan yang diakibatkan karena penumpukan citral di dalam tubuh yaitu hiperinsulinemia dan peningkatan toleransi glukosa (Modak & Mukhopadhaya, 2011). Namun hal tersebut dapat terjadi apabila mengonsumsi citral dengan makanan yang tinggi kalori. Hiperinsulinemia merupakan suatu keadaan yang dapat menyebabkan terjadinya peningkatan resistensi insulin pada jaringan adiposit (organ utama yang digunakan untuk penyimpanan energi yang mengakumulasi trigliserida). Resistensi insulin terjadi dimungkinkan karena pada saat mengonsumsi citral, retinaldehida yang terdapat dalam tubuh mengalami peningkatan dan kemudian mengalami interaksi dengan reseptor gamma proliferasi peroksisom yang akan menyebabkan terjadinya peningkatan resistensi insulin (Ziouzenkova *et al.*, 2007). Oleh karena itu, dapat dikatakan bahwa citral terakumulasi pada jaringan adiposa yang merupakan jaringan lemak. Hal itu dikarenakan citral memiliki sifat yang tidak larut dalam air, namun larut dalam lemak (Brown, 2018). Selain

vanillin, citral juga adalah senyawa flavor yang paling penting dalam produk pangan. Penambahan citral dalam produk pangan seperti permen maupun minuman biasanya dalam bentuk *natural flavor* maupun *synthetic flavor*, penggunaan citral dalam produk pangan apabila bersamaan dengan pewarna sintetik dapat berpengaruh terhadap kesehatan yaitu signifikan menyebabkan penurunan kadar glutathione (GSH), yang nantinya dapat menyebabkan efek toksisitas yang mengarah pada nekrosis sel hati (Liu *et al.*, 1999).

5.3. Carvacrol

Carvacrol merupakan senyawa kimia yang berkontribusi dalam pembentukan rasa dan aroma dari oregano. Carvacrol biasanya ditemukan pada tanaman seperti *Oreganum dictamnus*, *Origanum vulgare* (Oregano Yunani), *Origanum majorana*, *Thymbra capitata* (oregano Spanyol), *Thymus vulgaris* dan *Thymus zygis* (thyme) (Vokou *et al.*, 1993). Carvacrol merupakan komponen utama dalam tanaman oregano dengan konsentrasi sekitar 95% (Kokkini *et al.*, 2003). Carvacrol banyak digunakan dalam produk pangan, beberapa diantaranya adalah minuman beralkohol, minuman non alkohol, makanan yang dipanggang, permen karet, permen lunak, susu beku, gelatin, puding, namun carvacrol penggunaannya paling banyak dalam bumbu penyedap (Ultee *et al.*, 1999). Selain itu Kokkini *et al* (2003) juga menyatakan bahwa karena carvacrol memiliki ciri khas yaitu mampu memberikan rasa yang gurih dengan aroma herbal, segar dan juga sangat tajam maka carvacrol sering digunakan sebagai penyedap dalam makanan yang biasanya ditambahkan dalam saus, sup dan juga daging kalengan.

Karena carvacrol penggunaannya cukup populer di seluruh dunia sebagai bumbu penyedap dalam produk pangan serta paling banyak digunakan dalam industri makanan cepat saji sehingga dapat dipastikan konsumsi paparan carvacrol dalam produk pangan cukup luas. Oleh karena itu perlu diketahui efek toksik yang mampu diberikan apabila konsumsi carvacrol dalam jumlah banyak maupun dalam jangka panjang maupun jangka pendek. Berdasarkan pada Tabel 4. dapat dilihat bahwa terdapat penelitian yang membahas mengenai toksisitas

dari senyawa flavor carvacrol. Berdasarkan pada Tabel 4. terdapat 3 penelitian toksisitas yang membahas mengenai efek toksik dari carvacrol dengan pemberian oral secara *in vivo* yaitu toksisitas akut, sub kronis dan kronis.

Berdasarkan pada Tabel 4. dapat dilihat bahwa ada 3 penelitian yang membahas mengenai toksisitas akut yaitu Rojas *et al* (2019), Andrade *et al* (2014) dan Damtie *et al* (2017). Pada penelitian Rojas *et al* (2019) dan Damtie *et al* (2017) menggunakan dosis yang hampir sama dengan dosis yang memberikan efek yaitu pada dosis 2000 mg/kg berat badan. Pada penelitian Rojas *et al* (2019) menyatakan bahwa pemberian dosis 2000 mg/kg berat badan mampu menyebabkan kematian pada hewan uji selama pemberian 24 jam, namun efek toksisitas yang ditimbulkan sebelumnya menyerang pada sistem pernafasan, dan juga saraf pusat. Efek toksisitas yang menyerang pada bagian saraf pusat adalah salah satu faktor utama terjadinya kematian karena sebelumnya terjadi kelesuan, koma kemudian kematian pada hewan uji. Selain menyerang pada bagian saraf pusat terjadi perubahan perilaku dan juga mati rasa dan perubahan yang terjadi merupakan efek dari pemberian dosis 2000 mg/kg berat badan. Berbeda dengan penelitian Damtie *et al* (2017) pemberian dosis 2000 mg/kg berat badan tidak memberikan efek kematian dalam waktu 24 jam namun menghasilkan efek yaitu pengurangan berat badan, kejang, tremor dan juga depresi. Berdasarkan pada kedua penelitian tersebut efek toksik yang diberikan carvacrol lebih mengarah pada sistem saraf. Hal itu juga sesuai dengan teori EMA (2014) yang menyatakan bahwa carvacrol mampu memberikan efek pada penurunan aktivitas lokomotor dalam pengujian toksisitas akut dengan menggunakan tikus. Aktivitas lokomotor berhubungan dengan sistem saraf, karena sistem saraf berperan dalam memproses adanya informasi yang berasal dari bagian sesorik.

Selain itu terjadi perubahan histopatologi pada bagian paru-paru hewan uji yang berhubungan dengan pneumonitis yang mungkin saja diakibatkan oleh carvacrol (Rojas *et al.*, 2019). Hal itu dikarenakan ciri khas dari senyawa

tersebut yaitu mudah menguap dan memiliki bau yang cukup tajam (Kokkini *et al.*, 2003). Perubahan histopatologis lain yang dihasilkan yaitu terdapat pada ginjal yaitu menyebabkan nefropati kronis. Nefropati itu sendiri merupakan salah satu tanda adanya kerusakan ginjal yang nantinya akan berkaitan dengan gagal ginjal. Carvacrol juga mampu memberikan efek toksik yaitu menyebabkan pembesaran pada limpa yang diamati pada pemeriksaan histopatologi. Apabila organ limpa mengalami pembengkakan maka akan berkaitan dengan kerja limpa yang menjadi tidak optimal. Sedangkan limpa memiliki peran yang sangat penting dalam tubuh sebagai pengatur sistem peredaran darah dan juga dalam pembentukan antibodi. Apabila ukuran limpa lebih besar dari ukuran normal maka akan mengakibatkan sel darah merah yang terbawa dalam aliran darah jumlahnya sedikit (Handayani, 2008). Sehingga dapat dikatakan carvacrol dapat memberikan efek toksisitas apabila mengonsumsi dalam jumlah 2000 mg/kg berat badan.

Berbeda dengan penelitian toksisitas akut yang dilakukan oleh Andrade *et al* (2014) menunjukkan bahwa tidak adanya efek toksisitas yang dihasilkan dari carvacrol yang diberikan secara oral selama 24 jam. Selain itu pada pemeriksaan histopatologi yaitu pada organ hati, jantung, dan juga ginjal juga tidak menunjukkan adanya perubahan yang signifikan dibandingkan dengan kontrol. Hal itu dapat terjadi karena dosis yang digunakan dalam pengujian toksisitas akut memiliki nilai yang jauh lebih rendah dibandingkan dengan penelitian Rojas *et al* (2019) dan Damtie *et al* (2017) yang mampu menunjukkan efek toksisitas pada pemberian dosis 2000 mg/kg berat badan. Pada studi lain yang mempelajari mengenai toksisitas akut carvacrol juga menyatakan bahwa senyawa ini memiliki nilai LD₅₀ (tikus) 1329,17 mg/kg berat badan per hari yang dinyatakan sebagai toksisitas tinggi (Almeida *et al.*, 2010). Penggunaan carvacrol sebagai bahan penyedap berdasarkan pada JECFA menyatakan bahwa carvacrol tidak menimbulkan masalah kesehatan ketika ditambahkan dalam produk pangan pada tingkat harian saat ini (JECFA, 2000).

Selain toksisitas akut, penelitian mengenai toksisitas sub kronis juga perlu dilakukan untuk mengetahui lebih lanjut efek toksisitas apabila mengonsumsi carvacrol dalam jangka waktu yang lebih lama. Berdasarkan pada Tabel 4. dapat dilihat bahwa terdapat 3 penelitian yang membahas mengenai toksisitas sub kronis yaitu Rojas *et al* (2019), Andrade *et al* (2014) dan Liana *et al* (2017). Dari ketiga penelitian tersebut dosis yang digunakan antara 50-500 mg/kg berat badan, namun memiliki hasil penelitian yang sama yaitu tidak ada adanya perubahan yang signifikan dari berat badan dan pada pemeriksaan histopatologi tidak ada perubahan yang signifikan dari bobot hati, jantung dan ginjal. Sehingga dapat dikatakan bahwa kurangnya efek toksisitas subkronis yang di hasilkan dari carvacrol yang diberikan pada tikus secara oral dengan dosis antara 50-500 mg/kg berat badan dengan waktu paling lama adalah 90 hari.

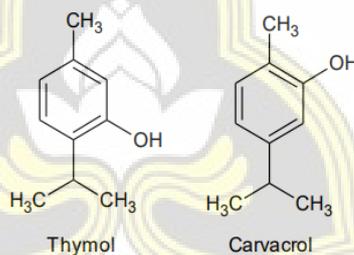
Selain dilakukan penelitian efek toksisitas pada hewan, perlu juga di lakukan penelitian efek toksisitas dari carvacrol pada tubuh manusia untuk mengetahui lebih lanjut efek yang ditimbulkan. Turkez & Aydin (2013) melakukan penelitian sitotoksitas dan genotoksitas dari carvacrol di dalam sel darah manusia dengan dosis yang digunakan yaitu 10, 25, 50, 75, 100, 150 dan 200 mg/L selama 24-48 jam. Berdasarkan pada penelitian tersebut menunjukkan hasil bahwa carvacrol berpengaruh terhadap peningkatan kadar LDH dalam sel darah manusia. Kadar LDH dalam sel darah sangat penting, karena LDH adalah indikator yang digunakan untuk mengetahui kerusakan dalam sel (Park *et al.*, 2010). Selain pengujian LDH, dalam penelitian ini juga dilakukan pengujian MTT, untuk mengetahui sitotoksitas dan juga sejauh mana suatu bahan kimia dapat menyebabkan kerusakan sel. Pada pengujian MTT didapatkan hasil bahwa pemberian carvacrol pada dosis 150 dan 200 mg/L menyebabkan penurunan secara signifikan viabilitas sel darah pada manusia. Penelitian lain yang melakukan efek toksisitas pada manusia juga menunjukkan bahwa pemberian carvacrol pada dosis 100 mg/L didapatkan hasil bahwa terjadi peningkatan jumlah kematian sel pada limfosit manusia (Aristatile *et al.*, 2010). Limfosit adalah sesuatu yang penting dalam tubuh yang memiliki peran dalam

sistem imun manusia. Apabila jumlah limfosit menurun maka akan berpengaruh pada kemampuannya terhadap sistem imun tubuh dan dikhawatirkan dapat menyebabkan tubuh rentan mengalami penyakit kanker serta paling parah mampu menyebabkan beberapa kerusakan organ (Bellelli *et al.*, 2019).

Penggunaan carvacrol dalam produk pangan juga perlu diperhatikan. Penggunaan carvacrol dalam produk pangan relatif cukup besar. Beberapa produk pangan yang menggunakan ekstrak oregano sebagai flavor yaitu makanan yang dipanggang, minuman non alkohol dan permen karet. Berdasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Ultee *et al* (1999) mendeteksi adanya jumlah carvacrol pada produk tersebut berbeda beda yaitu sebanyak 15,75 mg/kg untuk makanan yang dipanggang, sebanyak 28,54 mg/kg untuk minuman non alkohol, dan sebanyak 8,42 mg/kg untuk permen karet. Selain digunakan dalam produk pangan oregano juga digunakan dalam bidang farmasi sebagai obat, dan penggunaan ekstrak oregano dalam produk pangan tidak boleh melebihi jumlah yang digunakan untuk obat (Burt, 2004). Sedangkan *Natural Health Products Directorate of Canada* menetapkan bahwa penggunaan carvacrol pada obat dianjurkan tidak lebih dari 2,7 mg/kg berat badan untuk orang dewasa (Gaur *et al*, 2018). Berdasarkan *Maximum Survey- Derived Dietary Intake (MSDRI) for the European Union* menetapkan bahwa batas konsumsi carvacrol per hari pada orang dewasa untuk makanan yaitu sekitar 0,23 mg/kg berat badan. Berdasarkan penelitian tersebut, dapat disimpulkan bahwa penggunaan carvacrol dalam produk pangan memiliki nilai yang cukup tinggi melebihi batas yang ditentukan untuk penggunaan obat, sehingga mungkin saja dapat memberikan resiko apabila dikonsumsi dalam jangka waktu yang cukup panjang (Gaur *et al*, 2018).

Carvacrol memiliki struktur dan sifat yang hampir sama dengan senyawa kimia thymol, yang juga terdapat pada tanaman yang sama yaitu *Oreganum dictamnus*, *Origanum vulgare* (Oregano Yunani), *Origanum majorana*, *Thymbra capitata* (oregano Spanyol), *Thymus vulgaris* dan *Thymus zygis*

(thyme) (Vokou *et al.*, 1993). Sehingga efek toksisitas dari thymol juga perlu diketahui. Terdapat beberapa penelitian yang melakukan evaluasi keamanan dari thymol. Berdasarkan pada studi genotoksitas yang dilakukan oleh Maisanaba *et al* (2015) menyatakan bahwa thymol mampu menyebabkan penyimpangan pada struktur kromosom dan mampu menyebabkan kerusakan sel pada tingkat DNA. Berdasarkan penelitian Buyukleyla dan Rencuzogullari (2009) juga menyatakan thymol mampu memberikan efek genotoksitas namun tergantung pada konsentrasi yang diberikan, sehingga dapat dikatakan bahwa thymol pada dosis yang rendah tidak akan memberikan efek kerusakan DNA pada limfosit manusia. Hasil serupa juga dinyatakan oleh Ündeğer *et al* (2009) bahwa thymol tidak menunjukkan adanya kerusakan DNA pada pengujian dengan dosis 15, 25,50 dan 100 μM ($1 \mu\text{M}=1\text{mg/L}$) pada hewan uji tikus.



Gambar 8. Struktur kimia carvacrol dan thymol (Safwan *et al* 2012)

Carvacrol dan thymol merupakan kedua senyawa yang termasuk monoterpene yang memiliki sifat yang sama. Penggunaannya yang cukup banyak dalam produk pangan seperti bumbu penyedap, dll dapat menimbulkan dampak kesehatan apabila mengonsumsi dan terakumulasi di tubuh dalam jangka panjang. Kedua monoterpene tersebut mampu memberikan efek kesehatan hipotensi yang mungkin dapat terlihat pada pria berusia 45 tahun (Basch *et al.*, 2004). Selain itu Santos *et al* (2011) juga menyatakan bahwa kedua senyawa tersebut dapat menyebabkan terjadinya penurunan tekanan darah dari batas normal dan dapat menyebabkan penurunan denyut jantung. Namun kurangnya penelitian serta penjelasan mengenai mekanisme terjadinya efek dari akumulasi carvacrol dan thymol dalam tubuh manusia. Selain itu carvacrol dapat

mengalami reaksi dengan hidrogen peroksida menghasilkan senyawa benzokuinon dengan sejumlah kecil timokuinon (Naghdi Badi *et al.*, 2017). Benzokuinon ini mampu memberikan efek toksik yang dapat ditemukan pada bagian darah manusia selain itu juga mampu memberikan efek hematotoksik pada tubuh (Lin *et al.*, 2006). Berdasarkan pada studi toksisitas yang telah dijelaskan sebelumnya, dapat disimpulkan bahwa carvacrol terakumulasi dalam peredaran darah dan juga ginjal. Hal itu dikarenakan sifat dari carvacrol yang mudah larut dalam alkohol, sehingga memungkinkan memberikan efek toksik yang signifikan pada bagian gastrointestinal (*National Center for Biotechnology Information*, 2022). Carvacrol memiliki sifat yang mudah menguap dan apabila paparan dalam jangka waktu yang panjang maka akan berpengaruh terhadap sistem neurologis (Dick, 2006). Carvacrol juga terakumulasi di dalam darah, hal itu dikarenakan carvacrol memiliki sifat yang larut dalam alkohol. Berdasarkan pada teori Cederbaum (2012) menyatakan bahwa senyawa yang larut dalam alkohol dan tertelan dalam tubuh, tidak dapat disimpan dalam tubuh, namun berada dalam darah hingga nantinya dihilangkan. Hal tersebut berhubungan dengan kerja hati dan ginjal dalam melakukan oksidasi senyawa tersebut untuk kemudian dihilangkan dalam tubuh (Cederbaum, 2012).

Berbeda dengan vanillin dan citral yang mudah mengalami degradasi pada suhu yang tinggi dan tergantung pada pH, carvacrol termasuk dalam senyawa yang stabil dan tidak mudah mengalami oksidasi pada suhu yang tinggi. Berdasarkan pada penelitian Chambre *et al* (2020) yang melakukan penelitian terhadap ekstrak tanaman Stureja yang mengandung carvacrol sebagai komponen utamanya dengan melakukan perlakuan panas untuk mengetahui stabilitasnya. Pada penelitian tersebut didapatkan hasil bahwa carvacrol stabil terhadap suhu yang tinggi yaitu pada paparan panas 160, 175 dan 190°C, bahkan carvacrol mengalami peningkatan konsentrasi yang dipastikandengan menggunakan GC MS.

5.4.Cinnamaldehyde

Cinnamaldehyde merupakan salah satu senyawa flavor yang populer selain vanillin, citral dan menthol. Cinnamaldehyde memiliki ciri berwarna kuning pucat dengan bau yang hangat, manis, dan juga rasa yang pedas yang mengingatkan akan kayu manis (Gowder & Halagowder, 2010). Cinnamaldehyde ini dikatakan sebagai senyawa flavor yang mampu memberikan flavor kayu manis, dikarenakan cinnamaldehyde merupakan komponen utama yang terdapat dalam tanaman kulit kayu manis dengan kandungan sekitar 65-75% (Attokaran, 2017). Senyawa kimia ini biasanya digunakan dalam produk pangan maupun sebagai wewangian. Cinnamaldehyde dapat dijumpai dalam beberapa produk pangan seperti juice, cereal, makanan bayi dan juga dessert, chewing gum, kue, puding dan saus apel (Gowder & Devaraj, 2006; Blakemore & Thomson, 1983).

Berdasarkan teori Kartikar dan Basu (1975) menyatakan bahwa cinnamaldehyde adalah salah satu flavor yang paling banyak digunakan dalam produk pangan dan paparan konsumsi paling banyak di negara India. Karena penggunaannya yang cukup luas di wilayah India dalam produk pangan, sehingga diperlukan data penelitian mengenai efek toksik penggunaan cinnamaldehyde. Berdasarkan pada Tabel 5. dapat dilihat bahwa terdapat penelitian yang membahas mengenai toksisitas akut dan sub kronis dari cinnamaldehyde yang diberikan secara oral secara *in vivo*.

Berdasarkan penelitian sub kronis yang dilakukan oleh Gowder & Devaraj (2006) menyatakan bahwa pada pemberian cinnamaldehyde dengan dosis 73,5 mg/kg berat badan selama 90 hari tidak terjadi perubahan yang signifikan pada perilaku hewan uji dibandingkan dengan kontrol. Namun pada dosis tersebut menunjukkan bahwa cinnamaldehyde memiliki efek pada sistem saraf pusat. Hal itu diketahui bahwa terjadinya penurunan aktivitas serum AChE pada hewan uji. Berdasarkan pada teori Rickwood *et al* (2004) menyatakan bahwa serum AChE digunakan sebagai salah satu penanda biologis adanya toksisitas yang

merugikan dan juga neurotoksisitas. Selain itu pada dosis tersebut juga memberikan efek pada penurunan berat badan. Terjadinya penurunan berat badan merupakan ekspresi adanya toksisitas umum karena menurunnya tingkat konsumsi makanan (Luster *et al.*, 1982). Cinnamaldehyde juga mampu menginduksi terjadinya peroksidasi lipid yang diamati sebagai parameter perilaku tikus (pada saat pemberian dosis 73,5 mg/kg berat badan). Penyebab adanya peroksidasi lipid yaitu dikarenakan stress oksidatif. Sedangkan stress oksidatif dapat terjadi karena adanya radikal bebas. Terjadinya peroksidasi lipid dapat mengakibatkan beberapa penyakit seperti peradangan, penyakit neurodegeneratif dan juga kanker (Setiawan & Suharto, 2007). Pada pemeriksaan histopatologi pada hewan uji tidak menunjukkan perubahan yang signifikan pada beberapa organ.

Berbeda dengan penelitian Carpanini *et al* (1973) yang dilakukan dengan waktu yang tidak jauh berbeda dengan Gowder & Devaraj (2006) menyatakan bahwa pada pemeriksaan histopatologi pada pemberian dosis 400 ppm menyatakan bahwa terjadi peningkatan berat hati. Peningkatan bobot hati tersebut tidak disertai dengan perubahan fungsi organ. Berdasarkan teori Goiberg (1967) menyatakan bahwa hal itu dapat terjadi karena stimulasi dari enzim mikrosomal. Enzim mikrosomal itu sendiri terletak pada mikrosom sel hati yang memiliki peran dalam me-metabolisme suatu obat atau senyawa kimia. Oleh karena itu, proses pembesaran hati bisa saja dikarenakan oleh rangsangan fisiologis akibat dari metabolisme di hati. Hal itu sesuai dengan teori Keman (2020) yang menyatakan bahwa enzim mikrosomal yang memiliki peran dalam biotransformasi senyawa toksik eksogen akan mengalami respon toksik dengan memberikan rangsangan yang disebabkan oleh senyawa toksik eksogen. Menurut Carpanini *et al* (1973) menyatakan bahwa belum dipastikan peningkatan bobot hati diakibatkan oleh stimulasi dari enzim mikrosomal, sehingga dianggap sebagai efek toksisitas dari cinnamaldehyde. Sehingga berdasarkan penelitian tersebut dapat dikatakan bahwa bahwa dalam

penggunaan cinnamaldehyde harus diturunkan karena cinnamaldehyde mampu memberikan efek toksisitas tergantung dari waktu dan dosis yang digunakan. Karena kurangnya literatur yang membahas mengenai efek toksisitas akut dari pemberian oral cinnamaldehyde, terdapat salah satu penelitian yang melakukan pengujian selama 24 jam dengan pemberian secara oral pada hewan uji berupa tikus. Pada penelitian Yuan *et al* (1992) yang dilakukan dengan mengukur cinnamaldehyde dalam darah melalui pemberian secara oral. Pemberian cinnamaldehyde melalui rute oral dengan dosis yaitu 50, 250 dan 500 mg/kg berat badan mampu di pertahankan dalam waktu yang cukup lama dalam darah. Sedangkan nilai LD₅₀ (tikus) cinnamaldehyde berkisar antara 3,5-4,9 g/kg berat badan (3500-4900 mg/kg berat badan) pada tikus (Jenner *et al.*, 1964; Zaitsev and Rakhmanina, 1974; Sporn *et al.*, 1974). Berdasarkan pada FAO/WHO (1967, 1968) asupan harian yang dapat diterima bersyarat untuk pria (ADI) dari 0-1,25 mg/kg bb. Namun evaluasi terbaru pada tahun 2000 oleh JECFA menyatakan bahwa cinnamaldehyde tidak menimbulkan masalah kesehatan apabila dikonsumsi pada tingkat harian saat ini. Kadar cinnamaldehyde yang dapat dipertahan dalam darah dapat berhubungan dengan hati dan juga ginjal. Gowder dan Devaraj (2006) juga menyatakan bahwa cinnamaldehyde yang berada dalam darah nantinya pasti akan melewati metabolisme di hati dan apabila paparan konsumsi cinnamaldehyde dalam waktu yang cukup lama dan konsentrasi yang cukup tinggi maka akan berdampak pada ginjal. Oleh karena itu Carpanini *et al* (1973) menyatakan bahwa dosis penggunaan cinnamaldehyde harus diturunkan karena berhubungan dengan efek toksisitas dari dosis dan waktu yang digunakan.

Cinnamaldehyde tergolong dalam senyawa yang memiliki toksisitas yang rendah. Sifatnya yang memiliki kelarutan dalam air dan alkohol (*National Center for Biotechnology Information*, 2022) dapat menimbulkan toksisitas pada organ hitopatologi dan sistem saraf. Berdasarkan pada penelitian sub kronis, cinnamaldehyde lebih terakumulasi pada bagian sistem saraf, terutama pada sistem saraf pusat, selain itu juga menimbulkan peningkatan pada bobot

hati. Sifatnya yang mudah menguap, apabila paparan dalam jangka waktu yang panjang maka akan berpengaruh terhadap sistem neurologis (Dick, 2006). Selain berpengaruh terhadap sistem saraf, sifatnya yang larut dalam air juga menjadi perhatian. Efek paparan sub kronis lain dari cinnamaldehyde adalah terjadinya peningkatan bobot hati, Seperti yang dilaporkan oleh Carpanini *et al* (1973) yang menyatakan bahwa dianggap sebagai efek toksisitas dari cinnamaldehyde. Hal itu dikarenakan hati merupakan salah satu organ yang memiliki peran dalam mengeliminasi racun. Berdasarkan teori Pizzo (2015) menyatakan bahwa toksisitas pada organ hati dapat terjadi, apabila senyawa kimia, obat yang masuk dalam tubuh melalui oral memiliki sifat yang larut dalam air. Dapat disimpulkan bahwa paparan jangka panjang dalam mengonsumsi cinnamaldehyde dengan dosis yang melebihi batas ADI yaitu 0,7 mg/kg berat badan dapat menyebabkan efek toksisitas yang terakumulasi pada hati dan sistem saraf karena terjadinya penumpukan akibat konsumsi jangka panjang.

Cinnamaldehyde juga mampu mengalami oksidasi seperti vanillin dan citral. Cinnamaldehyde memiliki sifat kimia yaitu reaktivitasnya yang tinggi, sehingga stabilitas termal dari cinnamaldehyde perlu diperhatikan. Oksidasi cinnamaldehyde biasanya dikatalis dengan adanya oksigen, NaCl, dan H₂O₂ yang menunjukkan karakteristik dari adanya reaksi radikal bebas (Chen *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2005). Berdasarkan teori Tandon *et al* (2008) menyatakan bahwa cinnamaldehyde mampu teroksidasi tanpa adanya katalis apabila cinnamaldehyde kontak dengan udara dan berada pada suhu kamar karena ikatan terkonjugasi yang tidak stabil dan gugus aldehida dalam struktur molekulnya. Hal itu menyebabkan cinnamaldehyde kurang maksimal dalam penerapannya. Seperti contoh cinnamaldehyde biasanya digunakan sebagai bahan tambahan pangan (flavoring agent). Apabila cinnamaldehyde mengalami oksidasi maka akan berpengaruh pada flavor yang dihasilkan sehingga dapat menyebabkan penurunan kualitas dalam makanan (Yu *et al.*, 2020). Pound, A & Pound, J (2002) menyatakan bahwa suhu rendah menjadi perhatian dalam

oksidasi cinnamaldehyde, hal itu dikarenakan kontak antara cinnamaldehyde dengan udara dalam produksi, transportasi dan penyimpanan yang tak terhindarkan mampu membentuk peroksida organik (hidrogen peroksida) yang berkaitan dalam mengurangi kualitasnya. Berdasarkan Watt *et al* (2004) menyatakan bahwa hidrogen peroksida yang tertelan di dalam tubuh dapat memberikan dampak yang buruk bagi kesehatan seperti khususnya pada bagian saluran pencernaan seperti mual, muntah, bahkan sampai menyebabkan mulut berbusa kemudian busa tersebut dapat menyebabkan penyumbatan pada saluran pernafasan. Setelah terbentuk peroksida organik, kemudian menghasilkan cinnamaldehyde epoksida (3-fenil-2,3-epoksi-propanal) yang nantinya akan dibelah dan terbentuk senyawa baru yaitu benzaldehida (Wright & Abbot, 1993). Berdasarkan beberapa penelitian yang dilakukan secara oral pada hewan uji tikus didapatkan hasil bahwa benzaldehida tidak memberikan efek toksisitas, pada pemberian dosis 400-600 mg/kg berat badan selama 16 minggu (Andersen, 2006). Apabila cinnamaldehyde kontak dengan oksigen dan mengalami reaksi oksidasi maka produk yang dihasilkan adalah asam sinamat (Yu *et al.*, 2020). Oleh karena itu toksisitas dari asam sinamat juga perlu diperhatikan.

Asam sinamat memiliki toksisitas yang sangat rendah. Hal itu dikarenakan pada penelitian yang dilakukan Yen *et al* (2016) mengenai pengaruh dari asam sinamat pada tikus yang mengalami toksisitas pada hepa yang diinduksi oleh etanol menghasilkan bahwa asam sinamat mampu meningkatkan infiltrasi sel radang. Infiltrasi sel radang tersebut biasanya diartikan sebagai suatu pertahanan dari suatu penyakit atau bisa disebut sebagai vaksin penyakit (Oktaviandari *et al.*, 2020), selain itu juga membantu dalam menyembuhkan adanya penyakit (Adinata *et al.*, 2012; Sembiring & Manoi, 2011). Selain itu pada penelitian lain (Khaksari *et al.*, 2021) yang melakukan pengujian histopatologi pada tikus dengan pemberian asam sinamat selama 12 hari menyatakan bahwa pemberian asam sinamat mampu menurunkan aktivitas dari *serum aspartate aminotransferase* (AST) dan *alanin transaminase* (ALT)

secara signifikan pada hewan uji. Kedua serum tersebut digunakan sebagai salah satu penanda untuk mengetahui adanya gangguan pada bagian hati. Apabila kedua serum tersebut kadarnya mengalami peningkatan maka kemungkinan terjadi adanya kerusakan pada bagian hati. Sehingga jika serum AST dan ALT mengalami penurunan yang signifikan dapat disimpulkan bahwa asam sinamat tidak memberikan efek toksik pada hati. Pada penelitian lain yang dilakukan oleh Babaeenezhad *et al* (2021) juga menyatakan bahwa asam sinamat memiliki efek hepatoprotektif terhadap adanya kerusakan pada hati.

Produk oksidasi yang dihasilkan yaitu benzaldehida dan asam sinamat yang sering terjadi, tidak memberikan efek toksisitas pada tubuh meskipun dalam paparan cukup lama. Cinnamaldehyde juga dikenal memiliki sifat biologis yang baik yaitu sebagai antiinflamasi, antidiabetes dan antitumor (Liao *et al.*, 2012). Selain terakumulasi pada sistem saraf dan organ hati, pada usia tua yaitu sekitar 70 tahun cinnamaldehyde dapat berpengaruh terhadap berkembangnya kanker yang semakin meningkat pada tubuh, karena berkaitan dengan terjadinya penurunan imunosurveilans (sistem kekebalan tubuh) pada orang tua (Pawelec *et al.*, 2010). Berhubungan dengan sifat bioavailabilitasnya, cinnamaldehyde dan alkohol serta turunannya dapat dengan cepat diserap melalui usus yang nantinya dapat diekskresikan melalui urin dan hal tersebut tidak berpengaruh pada jumlah dosis yang dikonsumsi (hingga 250 mg/kg) maupun jenis kelamin. Ketika cinnamaldehyde dikonsumsi, cinnamaldehyde (kemudian diubah menjadi asam sinamat dalam darah sekitar 37-60% dan dapat di pertahankan dalam tubuh selama 24 jam (Yuan *et al.*, 1992). Hal tersebut dapat berpengaruh terhadap penekanan pada sistem kekebalan tubuh. Selain itu terdapat 2 penelitian yang dilakukan secara *in vivo* dengan pemberian ekstrak kayu manis dengan dosis yang cukup tinggi, dengan tujuan untuk melihat pengaruh cinnamaldehyde terhadap sifatnya sebagai agen terapi kanker. Didapatkan hasil bahwa terjadi sedikit penurunan pertumbuhan sel tumor, namun efek lain yang ditimbulkan adalah terjadinya penurunan yang cukup parah pada organ kekebalan seperti limpa maupun kelenjar getah bening (Kwon *et al.*, 2010).

Akumulasi cinnamaldehyde dalam tubuh yang menyebabkan efek berupa penurunan sistem kekebalan tubuh merupakan karakteristik umum terjadinya toksisitas dari cinnamaldehyde, mengingat bahwa cinnamaldehyde memiliki tingkat toksisitas yang cukup rendah (Roth –Walter *et al.*, 2014).

5.5. Menthol

Menthol merupakan senyawa flavor yang termasuk dalam alkohol monoterpen siklik dan merupakan komponen utama yang terdapat dalam peppermint serta minyak mint lainnya. Menthol biasanya terdapat dalam tanaman *Mentha piperita* L. (peppermint), *Mentha arvensis* (Adams *et al.*, 1996). Ciri khas menthol yaitu memiliki rasa dan aroma mint yang menyenangkan (Grumezescu dan Holban, 2017). Menthol adalah salah satu flavor yang penting dan cukup banyak digunakan dalam industri pangan (Kamatou *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2010). Menthol biasanya diaplikasikan pada produk pangan seperti coklat, permen, permen karet, minuman keras dan teh (Kamatou *et al.*, 2013). Penggunaan menthol biasanya di tambahkan dalam jumlah sekitar 6 ppm untuk produk daging, 95 ppm untuk produk susu dan sekitar 8300 ppm digunakan untuk produk permen (Cohen *et al.*, 2020). Selain itu menthol adalah flavor terpenting ketiga di dunia selain flavor vanilla dan jeruk (Thorup *et al.*, 1983). Nilai acceptable daily intake (ADI) untuk menthol itu sendiri dilaporkan sekitar 0-0,2 mg/kg (FAO/WHO, 1976), namun penentuan ADI tersebut tidak di dukung dengan adanya data toksikologi. Karena penggunaannya cukup luas seperti senyawa flavor sebelumnya dalam industri pangan dan paparan konsumsi mungkin dalam jangka waktu yang panjang, maka perlu diketahui efek toksisitas yang mungkin saja ditimbulkan.

Berdasarkan pada Tabel 6. dapat dilihat bahwa terdapat beberapa penelitian yang membahas mengenai toksisitas menthol yaitu toksisitas akut, sub akut dan juga sub kronis. Pada penelitian toksisitas akut yang dilakukan oleh Mugisha *et al* (2014) didapatkan hasil bahwa pada dosis 18.000 mg/kg berat badan menghasilkan kematian pada hewan uji dan pada dosis 12.000 mg/kg berat badan menghasilkan efek toksisitas berupa kejang, hiperurisasi dan otot kerut

berkedut. Dosis yang digunakan dalam penelitian tersebut cukup besar sehingga menghasilkan efek yang cukup kuat bahkan hingga kematian. Sedangkan LD₅₀ (tikus) untuk menthol ini sendiri telah dilaporkan kisaran 2.410-4.441 mg/kg pada hewan tikus (Eickholt & Box 1965; Nair 2001; Ohsumi *et al.*, 1984). Telah dilaporkan bahwa nilai LD₅₀ dapat dikategorikan menjadi 5 kelas yang berbeda yaitu sangat amat beracun (<0,1 mg/kg), sangat beracun (50-500 mg/kg), cukup beracun (500-5000 mg/kg) dan sedikit beracun (5000-15000 mg/kg) (Nazari *et al.*, 2017). Sehingga dapat dikatakan bahwa menthol adalah flavor yang memiliki tingkat toksisitas yang cukup rendah karena nilai LD₅₀ menthol berada di antara kisaran 500-5000 mg/kg. Selain itu OECD SIDS (2003) juga menyatakan bahwa isomer menthol yang terdapat dalam minyak esensial pappermint telah terbukti memiliki toksisitas akut yang rendah.

Pada pengujian toksisitas sub akut yang dilakukan dalam waktu 28 hari menunjukkan tidak ada tanda-tanda toksisitas yang signifikan yang dihasilkan selama pemberian menthol secara oral pada hewan uji. Pada penelitian Mugisha *et al* (2014) dengan dosis yang digunakan adalah 500, 1000 dan 1500 mg/kg berat badan menunjukkan hasil peningkatan pada ALT dan AST namun pada saat pemeriksaan histopatologi tidak adanya perubahan yang terjadi pada fungsi hati. Hal itu tidak dinyatakan sebagai efek toksik karena tidak mempengaruhi fungsi dari organ tersebut. Pengujian histopatologi pada ginjal juga dievaluasi. Di dapatkan hasil bahwa tidak adanya tanda kerusakan pada ginjal dari paparan sub akut menthol yang ditunjukkan dari tidak adanya pengaruh yang signifikan pada serum urea dan kreatin (yang digunakan sebagai penanda kerusakan pada ginjal). Penelitian toksisitas sub akut lain yang dilakukan oleh Thorup *et al* (1983) dengan dosis 0, 10, 40 dan 100 mg/kg berat badan dan 0, 200, 400 dan 800 mg/kg berat badan juga tidak menghasilkan efek toksisitas yang signifikan pada hewan uji. Pada penelitian ini tidak terjadi adanya perubahan pada berat badan dan juga pada pengecekan histopatologi tidak terjadi perubahan yang signifikan pada bobot organ. Selain itu pada dosis 100 mg/kg berat badan menunjukkan hasil bahwa timbulnya nefropati (pembentukan tetesan hialin) dan

terdapat ruang seperti kista yang letaknya tersebar pada suatu jaringan serebral (yang terletak pada bagian otak). Berdasarkan pada penelitian Spindler & Madsen (1992) menyatakan bahwa tidak ada bukti degenerasi epitel yang terjadi pada bagian otak.

Terdapat 2 penelitian yang membahas mengenai toksisitas sub kronis yang dilakukan secara *in vivo* pada hewan uji berupa tikus. Berdasarkan pada penelitian Spindler & Madsen (1992) dengan dosis yang digunakan yaitu 0, 10, 40 dan 100 mg/kg berat badan didapatkan hasil bahwa pada pemberian dosis 100 mg/kg berat badan menunjukkan hasil yang sama dengan penelitian Thorup *et al* (1983) yang menyatakan bahwa ditemukan ruang seperti kista yang terletak pada bagian otak. Namun perubahan dan asal-usul kejadian tersebut tidak jelas. Selain itu juga terjadi timbulnya nefropati pada pengujian histopatologi, yang dinyatakan sebagai efek dari toksisitas sub kronis dari menthol. Pada penelitian Toyoda *et al* (2021) toksisitas sub kronik dari menthol menyatakan bahwa pada pemberian dosis 250 mg/kg berat badan menthol juga mengakibatkan timbulnya nefropati pada ginjal dan peningkatan bobot organ pada pemeriksaan histopatologi pada tikus. Masalah nefropati tersebut dianggap tidak mungkin terjadi pada manusia. Hal itu dikarenakan protein α_2 -globulin tidak terdapat pada tubuh manusia (Greaves, 2012). Krieger (2001) juga menyatakan bahwa α_2 -globulin tidak diamati pada manusia, sehingga adanya α_2 -globulin yang terdapat dalam lesi ginjal pada tikus jantan tidak dapat dianggap secara relevan sebagai penilaian resiko dalam tubuh manusia. Kurangnya efek toksisitas yang dihasilkan selama pengujian dengan pemberian menthol pada hewan uji baik selama pemberian paparan yang lebih panjang dan pendek dapat dikatakan aman (Mugisha *et al.*, 2014). Meskipun menthol tergolong aman, apabila mengonsumsi dalam jumlah yang cukup tinggi dampak yang dapat ditimbulkan yaitu dapat menyebabkan sakit perut maupun diare (Burt, 2004).

Mint flavor yang berasal dari tanaman peppermint terdiri dari beberapa senyawa penyusunnya seperti menthol, menthone, pulegone dan methofuran (Kapp *et al.*, 2020). Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya, bahwa flavor yang berasal dari peppermint biasanya paling banyak digunakan dalam produk pangan seperti teh dan permen. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Pakc *et al* (2013) menyatakan bahwa kandungan menthol yang terdapat dalam beberapa sampel permen yaitu sekitar 3,9 mg/kg. Jumlah menthol yang terdapat pada sampel tidak sesuai dengan jumlah yang tertera dalam kemasan yaitu 2 mg. Sedangkan *Council of Europe* (1974) menyatakan bahwa nilai ADI menthol yaitu sekitar 0-2 mg/kg. Berdasarkan nilai ADI tersebut, jumlah menthol yang terdapat dalam beberapa sampel permen melebihi batas yang ditetapkan. Berdasarkan WHO (2018) menyatakan bahwa nilai ADI menthol sekitar 0-4 mg/kg, sehingga kandungan menthol yang terdapat dalam sampel masih dalam batas aman. Sedangkan terdapat masalah yang harus diperhatikan, pulegone adalah salah satu senyawa yang berkontribusi memberikan flavor mint namun konsentrasinya lebih kecil dibandingkan dengan menthol.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Siano *et al* (2005) mengenai kandungan pulegone dalam beberapa produk makanan yang mengandung mint flavor yaitu permen dan sirup, jumlah pulegone yang terdeteksi pada kedua produk tersebut masing-masing yaitu 2,13-8,30 mg/kg (sirup) dan 0,45-30 mg/kg (permen). Berdasarkan *Annex II of Directive 88/388/EEC* mengenai flavor yang menetapkan jumlah maksimum penggunaan pulegone dalam makanan maupun minuman yaitu sebanyak 25 mg/kg untuk makanan dan sebanyak 100 mg/kg untuk minuman, namun dengan pengecualian untuk produk minuman dengan flavor mint yaitu sekitar 250 mg/kg. Sedangkan *European Parliament and the Council of the European Communities* (1988) menyatakan bahwa pulegone tidak boleh ditambahkan dalam produk makanan. Hal itu dikarenakan di Amerika Serikat pulegone dan methofuran termasuk dalam flavor sintetis. Kandungan pulegone dalam makanan menjadi masalah yang serius dikarenakan dalam beberapa produk pangan dengan flavor mint terdeteksi memiliki

kandungan pulegone yang cukup tinggi, oleh karena itu efek toksisitas dari pulegone perlu diperhatikan. Selain itu SCF (*European Commission*, 2002) juga menyatakan bahwa penting untuk mengetahui efek toksisitas yang ditimbulkan dan industri harus mempertimbangkan penggunaan flavor mint serta konsentrasi yang perlu dipertimbangkan dalam penggunaannya. Selain itu biasanya dalam produk pangan dengan flavor mint, sering ditambahkan dengan pulegone sintetis, dengan tujuan untuk meningkatkan rasa dan aroma dari menthol (Kapp *et al.*, 2020). Namun *Food and Drug Administration* (FDA) (2018) melarang adanya penggunaan pulegone sintetis sebagai bahan tambahan pangan. Sehingga dapat dikatakan senyawa menthol tergolong aman dan apabila memberikan efek toksik mungkin saja dipengaruhi oleh senyawa pulegone karena penggunaannya yang cukup banyak dalam produk pangan. Berdasarkan *Public Statement* (2014) menyatakan bahwa nilai NOAEL pulegone terlapor sekitar 20 mg/kg berat badan per hari, namun hal itu dinyatakan belum pasti mengenai nilai tersebut. Meskipun demikian untuk senyawa pulegone memiliki nilai *tolerable daily intake* (TDI) dengan dosis sekitar 0,1 mg/kg berat badan yang telah ditetapkan untuk produk makanan. Sehingga dapat disimpulkan bahwa jumlah pulegone yang terdeteksi dalam produk makanan memiliki nilai yang jauh dengan nilai TDI yang ditetapkan.

Menthol termasuk dalam senyawa flavor yang memiliki toksisitas yang cukup rendah, berdasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Hiki *et al* (2003) yang membandingkan efek dari konsumsi minyak peppermint dengan metode meta analisis didapatkan pada usia muda dibawah 70 tahun menthol tidak memberikan efek toksisitas yang signifikan sedangkan pada usia 70 tahun paparan menthol yang cukup panjang dapat memberikan efek seperti mulut kering, penglihatan kabur dan juga resistensi urin. Resistensi urin itu sendiri merupakan kondisi dimana tertumpuknya urin yang terdapat pada kandung kemih dan tidak dapat melakukan pengosongan pada kandung kemih dengan sempurna (Padlilah, 2017). Selain itu You *et al* (2020) menyatakan bahwa konsumsi menthol tidak memberikan efek toksisitas pada bagian

gastrointestinal (sistem pencernaan), hal itu dikarenakan menthol tergolong senyawa flavor yang memiliki toksisitas yang cukup rendah dan memiliki sifat yang tidak larut dalam air namun sangat larut dalam alkohol (*National Center for Biotechnology Information* (2022)). Hal itu sesuai dengan studi toksisitas sub kronis yang terdapat dalam tabel 6 yang menyatakan bahwa tidak terjadinya efek yang signifikan pada ginjal dan perubahan bobot organ, dikarenakan tidak adanya protein α_2 -globulin tidak terdapat pada tubuh manusia (Greaves, 2012). Tidak hanya vanillin, menthol juga dapat memberikan efek alergi apabila dikonsumsi. Namun efek alergi tersebut dapat terjadi karena reaksi reaksi yang ditimbulkan langsung oleh komponen yang terdapat dalam produk pangan. Beberapa faktor yang menyebabkan adanya reaksi tersebut adalah pewarna, pengawet dan juga antioksidan sintetis (Żukiewicz-Sobczak *et al.*, 2013). Efek alergi yang ditimbulkan sama seperti vanillin yaitu pilek yang diakibatkan karena produksi histamine yang berlebihan, mata berair dan bibir bengkak.

5.6. Perbandingan Toksisitas Kelima Senyawa

Berdasarkan dari kelima senyawa diatas dapat dibandingkan berdasarkan toksisitasnya, baik toksisitas akut, sub akut, sub kronis dan juga kronis. Terdapat kelima senyawa yang membahas mengenai toksisitas akut dengan pemberian dosis dalam jangka waktu \pm 24 jam. Dari kelima senyawa tersebut citral dan carvacrol menghasilkan kematian pada hewan uji dengan dosis yang sama yaitu pada dosis 2000 mg/kg berat badan. Dosis yang diberikan pada saat pengujian yang mampu menyebabkan sekitar 50% kematian kepada hewan uji pada pengujian toksisitas akut disebut sebagai LD₅₀ (BPOM, 2014). Sehingga LD₅₀ pada citral dan carvacrol pada penelitian tersebut yaitu 2000 mg/kg berat badan. Berdasarkan teori Nazari *et al.*, (2017) telah dilaporkan bahwa nilai LD₅₀ dapat dikategorikan menjadi 5 kelas yang berbeda yaitu sangat amat beracun (<0,1 mg/kg), sangat beracun (50-500 mg/kg), cukup beracun (500-5000 mg/kg) dan sedikit beracun (5000-15000 mg/kg). Berdasarkan nilai LD₅₀ tersebut, citral dan carvacrol termasuk dalam senyawa yang cukup beracun, dibandingkan pada vanillin, cinnamaldehyde dan menthol yang memiliki toksisitas rendah dikarenakan kurangnya efek toksisitas pada hewan uji.

Namun carvacrol lebih toksik dibandingkan dengan citral, hal itu dikarenakan selama pengujian terjadi kematian pada hewan uji dalam waktu 24 jam, sedangkan pada citral mengalami kematian pada hewan uji 2 hari setelah pemberian dosis. Selain itu LD₅₀ (tikus) carvacrol dilaporkan sekitar 1329,17 mg/kg berat badan per hari yang dinyatakan sebagai toksisitas tinggi (Almeida *et al.*, 2010) dibandingkan dengan citral dengan LD₅₀ (tikus) sekitar 1.424 mg/kg berat badan per hari (FEEDAP, 2016). Dari kelima senyawa flavor tersebut dapat diurutkan mulai dari yang berpotensi toksik hingga yang kurang berpotensi toksik yaitu carvacrol, citral, menthol, cinnamaldehyde dan vanillin. Hal itu dikarenakan nilai LD₅₀ (tikus) pada menthol, cinnamaldehyde dan vanillin berurutan yaitu 2.410-4.410 mg/kg berat badan per hari, 3.500-4.900 mg/kg berat badan per hari dan 4.978 mg/kg berat badan per hari. Semakin kecil nilai LD₅₀ maka semakin beracun senyawa kimia tersebut, begitu juga sebaliknya semakin besar nilai LD₅₀ maka semakin tidak beracun. Selain itu urutan tingkat toksisitas dilakukan berdasarkan nilai LD₅₀, dikarenakan LD₅₀ digunakan sebagai alat dalam mengklasifikasikan zat berdasarkan tingkat toksisitasnya (Teke & Kuete, 2014). Dari kelima senyawa tersebut masih tergolong aman untuk dikonsumsi dan tergolong dalam toksisitas yang rendah apabila berada dalam batas yang ditetapkan. Selain itu *National Toxicology Program* (NTP) (2003) juga menyatakan bahwa dari kelima senyawa tersebut tergolong toksisitas akut yang rendah, dikarenakan nilai LD₅₀ diatas 1000 mg/kg pada pemberian secara oral.

6. KESIMPULAN DAN SARAN

- Berdasarkan kelima senyawa flavor, urutan dari yang paling toksik ke senyawa yang memiliki toksisitas yang rendah yaitu carvacrol, citral, menthol, cinnamaldehyde dan vanillin.
- Untuk cinnamaldehyde dan carvacrol efek toksisitas lebih mengarah pada bagian sistem saraf pusat.
- Citral dan carvacrol efek toksisitasnya lebih mengarah pada bagian histopatologi yaitu organ hati dan ginjal.