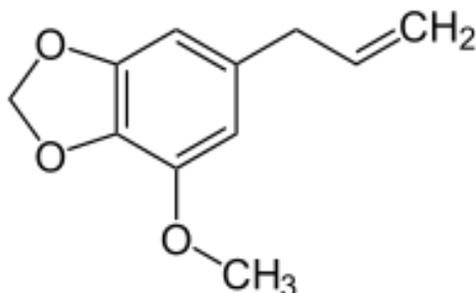


BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Miristisin

1. Deskripsi

Miristisin memiliki rumus molekul $C_{11}H_{12}O_3$ dengan nama lain *5-allyl-1-methoxy-2,3-(methylenedioxy)benzene*. Miristisin merupakan cairan tidak berwarna; seperti minyak cair; beraroma *balsamic-woody* yang hangat; berat molekul 192,21 g/mol; berat jenis 1416 pada $20^{\circ}C$ g/m^3 cm; titik didih $276,5^{\circ}C$; titik lebur $\pm 20^{\circ}C$; sukar larut dalam air; sedikit larut dalam etanol; larut dalam eter dan benzene; indeks bias 1,5403 pada $20^{\circ}C/D$ (NCBI, 2023); dan turunan dari senyawa fenilpropanoid dimana merupakan komponen utama dari minyak esensial biji atau fuli pala (*Myristica fragrans* Houtt) (Sudradjat *et al.*, 2018).



Gambar 1. Struktur molekul miristisin.

2. Isolasi senyawa miristisin

Miristisin dapat diisolasi dari minyak pala dengan metode destilasi bertingkat dikarenakan miristisin memiliki titik didih yang tinggi, sehingga menguap pada akhir proses distilasi, kemudian dianalisis menggunakan GC-MS. Kemurnian miristisin dianalisis menggunakan GC-MS menunjukkan konsentrasi 83,45% (Sudradjat *et al.*, 2018). Sampel miristisin yang digunakan pada penelitian ini adalah hasil isolasi miristisin menggunakan metode destilasi fraksinasi pengurangan tekanan dengan kemurnian 92,13% (Ansory *et al.*, 2020).

3. Sampel yang digunakan

Sampel miristisin yang digunakan pada penelitian ini adalah miristisin dengan kemurnian 92,13% yang diperoleh dari penelitian (Ansory *et al.*, 2020) dimana telah dianalisis menggunakan GC-MS, IR, H-NMR.

Tabel 1. Hasil analisis GC-MS sampel miristisin (Ansory *et al.*, 2020).

No	Waktu Retensi	Senyawa	Komposisi Miristisin (%)
1	28,858	Miristisin	92.13
2	23,923	Mirtenil asetat	2.21
3	24,771	α -Copaen	1.18
4	22,383	Safrol	0.98
5	18,913	4-terpinol	0.92
6	26,316	α -bergamoten	0.72
7	25,496	Metil eugenol	0.71
8	24,241	Eugenol	0.64
9	28,858	β -cadinin	0.43

Tabel 2. Analisis kelompok fungsional dengan FT-IR (Ansory *et al.*, 2020).

Bond type	Wavenumber (cm ⁻¹)
1128	-COC-
1357	-CH ₃
1435	-CH ₂ -
1627 dan 1504	(C=C) aromatik
2893	-CH (Csp ³)
3070	=CH (Csp ²)

Pada analisis struktur miristin oleh Ansory *et al.*, (2020) dengan H-NMR ditunjukkan hasil pergeseran kimia yaitu 3,28 ppm (m, -CH₂-); 3,87 ppm (s, -CH₃); 5,04 ppm (t, =CH₂); 5,90 ppm (m, -CH=); 5,91 ppm (s, -CH₂-); 6,34 ppm (s, Ar-H); dan 6,37 ppm (s, Ar-H).

Berdasarkan hasil analisis Souhoka *et al.*, (2018), identifikasi struktur miristisin dengan FTIR diketahui pada bilangan gelombang (cm⁻¹) 3076,51 (=C-H (alkena)); 2895,20-2976,21 (C_{sp³}-H (alifatik)); 1631,81 (C=C (alifatik)); 1431,21 (-CH₂- (metilen)); 1239,29 dan 1044,47 (C-O (eter)) dan H-NMR diketahui hasil pergeseran kimia yaitu 3,3 ppm (d, -CH₂-); 3,9 ppm (s, -OCH₃); 4,9-5,3 ppm (d, =CH₂); 5,5-6,2 ppm (s, O-CH₂-O); dan 6,5 ppm (s, 2H-Ar). Hasil tersebut dapat digunakan sebagai pembandingan dengan senyawa sampel yang diperoleh dari penelitian (Ansory *et al.*, 2020) sehingga dapat dibuktikan bahwa senyawa sampel penelitian ini adalah miristisin.

4. Pelarut yang digunakan

Pelarut yang digunakan pada penelitian ini adalah propilen glikol yang dianggap bahan relatif tidak beracun. Propilen glikol sering digunakan pada berbagai formulasi farmasi yang sebagian besar dimetabolisme di hati menjadi asam laktat dan asam piruvat. WHO menetapkan asupan harian propilen glikol per kg berat badan yang dapat diterima hingga 25 mg dengan nilai LD50 22.000 mg/kg BB tikus (Badan POM, 2023).

5. Aktivitas farmakologi

Miristisin diketahui memiliki aktivitas sebagai antidepresan dilihat melalui metode *forced swimming test* yang menunjukkan menurunnya durasi imobilitas dan meningkatnya aktivitas lokomotor hewan uji yang mengalami depresi (Prajindra, 2021). Miristisin memiliki mekanisme kerja dengan menghambat enzim *monoamine oksidase* (MAO) (Adelina, 2013), sehingga kadar neurotransmitter mengalami peningkatan karena tidak terjadi pemecahan dopamin, norepineprin, dan serotonin di otak (Semene *et al*, 2021), yang akan menyebabkan membaiknya suasana hati dan meningkatnya aktivitas fisik (Hasanusi *et al*, 2020).

Miristisin yang terkandung pada biji pala mampu menurunkan ansietas. Mekanisme miristisin sebagai antiansietas ini diduga bekerja melalui reseptor *GABAA-benzodiazepine* kompleks saluran reseptor CL karena meningkatnya kadar *Gamma-amine butyric acid* (GABA) di sistem saraf pusat (Hasanusi, 2020).

Miristisin diketahui memiliki aktivitas hepatoprotektif pada tikus yang mengalami kerusakan hati. Miristisin mampu menekan peningkatan konsentrasi serum TNF-alpha yang diinduksi *lipopolisakarida* (LPS)/*d-galaktosamin* (D-GaIN) dari makrofag dan fragmentasi hati pada tikus (Morita, 2003).

Manfaat lain dari miristisin yaitu sebagai antiinflamasi. Mekanisme kerja miristisin sebagai antiinflamasi diduga karena mampu menurunkan aktivitas *myeloperoksidase*, TNF-alpha, *interleukin*(IL)-1, dan IL-17 dan menghambat kadar faktor *nuklir-kappa B* di model kolitis (Badr *et al*, 2020).

6. Toksisitas miristisin

Penelitian uji toksisitas akut miristisin telah dilakukan oleh Putri (2022), dimana dianggap memiliki efek toksik yang menimbulkan kematian dengan dosis diperkirakan lebih dari 2000 mg/Kg BB pada mencit dan masuk ke dalam kategori toksik ringan. Hewan uji mengalami penurunan nafsu makan yang menyebabkan turunnya berat badan.

Pada penelitian Martin *et al*, (2014), dinilai mekanisme apoptosis yang disebabkan oleh miristisin dalam sel leukemia manusia. Miristisin dapat menyebabkan perubahan fungsi mitokondria, menginduksi apoptosis yang ditandai dengan perubahan potensial membran

mitokondria, pelepasan sitokrom c, dan memodulasi ekspresi gen dalam sel leukemia K562 manusia.

Miristisin diketahui dimetabolisme di hati oleh enzim kompleks sitokrom P450. Metabolisme ini menghasilkan metabolit yang tetap aktif yang diduga bertanggung jawab atas toksisitasnya (Seneme *et al*, 2021).

Miristisin diketahui memiliki gugus furan yang akan dimetabolisme menjadi *cis-2-butena-1,4-dial* yang sangat beracun untuk sel hati. Cincin furan yang mengalami pembelahan oksidatif dan membentuk kation radikal furan atau epoksida yang sangat reaktif, yang bereaksi langsung dengan nukleofil seluler sehingga mampu bereaksi langsung dengan DNA atau dengan protein seluler yang menyebabkan gangguan fungsi seluler dan kematian sel yang mungkin merupakan faktor penting dalam potensi karsinogenitas. Metabolit reaktif furan dapat menyebabkan mutasi pada gen seluler (Robles, 2014).

B. Uji Toksisitas Subkronis Oral

Uji toksisitas subkronis oral merupakan uji yang digunakan dalam mendeteksi efek berbahaya setelah diberikannya suatu sediaan dengan dosis berulang pada hewan uji secara oral pada sebagian umur hewan, tetapi tidak lebih dari 10% umur hewan. Prinsipnya yaitu pemberian sediaan setiap hari dengan beberapa tingkat dosis ke hewan uji selama 14, 28 atau 90 hari, dengan penambahan kelompok satelit yang berfungsi melihat ada tidaknya efek tertunda atau reversibel. Pada saat diberikannya sediaan, hewan uji diamati setiap hari untuk menentukan ketoksikan sediaan uji. Hewan uji yang mati pada pemberian suatu sediaan, segera dilakukan nekropsi, dan jaringan serta organ diamati secara makropatologi dan histopatologi. Nekropsi dilakukan saat periode akhir pemberian sediaan uji pada semua hewan uji yang masih hidup dan organ serta jaringan diamati secara makropatologi dan histopatologi kemudian dilakukan pemeriksaan gejala klinis dan histopatologi. Tujuan uji ini yaitu untuk mendapatkan informasi adanya efek berbahaya sediaan uji yang tidak terdeteksi oleh uji toksisitas akut, kemungkinan terjadi efek berbahaya setelah paparan suatu sediaan uji pada jangka waktu tertentu secara berulang, dosis yang tidak menimbulkan efek berbahaya, dan untuk mempelajari ada tidaknya efek kumulatif serta reversibilitas sediaan uji. Dosis batas uji per kg berat badan 1000 mg tidak memberikan efek berbahaya maka tidak harus

dinaikkan lagi walaupun dosis berbahaya untuk manusia belum tercapai (Peraturan BPOM, 2022).

C. Hewan Uji

1. Penentuan Hewan Uji

Prinsipnya untuk menentukan hewan uji sebaiknya dipertimbangkan berdasarkan cara metabolisme yang hampir sama dengan manusia, sensitivitas, kecepatan tumbuh dan kemudahan cara penanganan pada waktu percobaan sehingga hewan pengerat paling banyak digunakan pada uji toksisitas (Peraturan BPOM, 2022).

Menurut Peraturan BPOM (2022), penentuan hewan uji yang disarankan untuk uji toksisitas subkronis singkat oral 28 hari adalah rodensia tikus putih (galur *Sprague Dawley* atau *Wistar*) atau dapat menggunakan hewan rodensia lain dengan disertai justifikasi. Hewan uji harus sehat dengan umur 6-8 minggu, hewan betina diharuskan tidak pernah beranak dan sedang bunting, dan dikelompokkan sedemikian rupa secara acak dengan perbedaan dari rata-rata berat badan $\leq 20\%$. Berat badan tikus yang dipilih minimal 120 g.

Jumlah hewan uji yaitu kelompok kontrol, kelompok perlakuan (minimal 3 tingkat dosis), kelompok satelit terdiri dari kelompok satelit kontrol dan dosis tinggi dengan masing-masing kelompok minimal 10 ekor hewan yang terdiri dari 5 ekor hewan jantan dan betina (Peraturan BPOM, 2022).

2. Deskripsi tikus

Menurut Kartika *et al.*, (2013), taksonomi tikus adalah sebagai berikut :

Kingdom : Animal
Filum : Chordata
Kelas : Mamalia
Ordo : Rodentia
Famili : Muridae
Genus : Rattus
Spesies : *Rattus novergicus*

Tikus (*Rattus novergicus*) merupakan hewan pengerat dan sering digunakan sebagai hewan percobaan karena relatif mudah berkembang biak dan memiliki kelengkapan organ, ekskresi, kebutuhan nutrisi, pernafasan, sistem reproduksi, metabolisme biokimia, dan peredaran darah seperti manusia (Susanti, 2015).

3. Perawatan Hewan Uji

Pemeliharaan hewan uji harus dilakukan dengan menyesuaikan kondisi ruangan dimana hendaknya memenuhi persyaratan suhu, cahaya, kelembaban dan kebisingan yang sesuai dengan kebutuhan hidup hewan uji. Kandang terbuat dari material yang kedap air, kuat dan mudah dibersihkan secara berkala dengan luas area kandang per ekor mengacu pada *Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* oleh *National Research Council Amerika Serikat* (2011) dimana untuk tikus 100-200 g, luas kandang minimal 150 cm² dengan tinggi minimal 18 cm. Selain itu, pemberian pakan dan minuman hewan uji disesuaikan standar laboratorium dan diberikan ad libitum kecuali tujuan penelitian yang memerlukan pakan khusus atau pembatasan asupan pangan. Sebelum pengujian dimulai, hewan uji harus diaklimatisasi di ruang percobaan selama 5-7 hari (Peraturan BPOM, 2022).

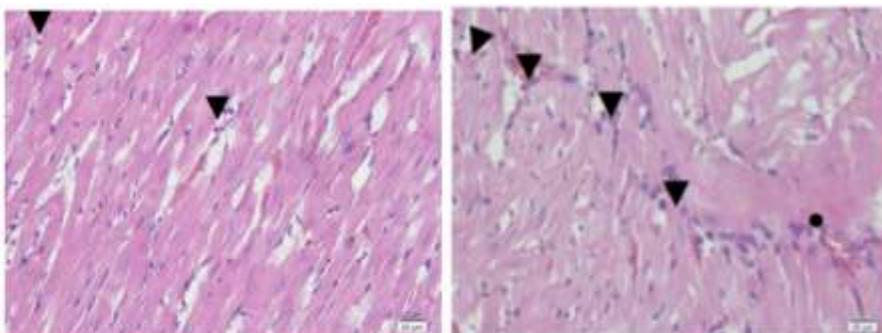
D. Jantung

Secara umum, jantung adalah organ berongga, berfungsi memompa darah dari jantung ke seluruh peredaran darah tubuh baik arteri maupun vena yang pada akhirnya akan bermuara kembali ke jantung. Sisi kiri jantung memompa darah keseluruh tubuh sedangkan sisi kanan jantung berfungsi memompa darah ke paru-paru. Kualitas kandungan darah yang beredar pada jantung dan seluruh tubuh dapat mempengaruhi anatomi organ lain dan khususnya pada organ jantung (Muhsi *et al.*, 2020).

Jantung normal tikus putih berbentuk kerucut dan berwarna merah, apabila ada warna putih di daerah ventrikel maka menunjukkan iskemia pada jantung (Widyaningsih *et al.*, 2017), dan memiliki berat $2,98 \pm 0,15$ mg/g BB pada 16 ekor tikus putih seberat 180-220 g. Organ jantung dapat dirusak oleh berbagai jenis zat atau senyawa dengan bekerja secara langsung pada otot jantung atau secara tak langsung melalui susunan pembuluh darah atau saraf (Perdana *et al.*, 2020). Nekrosis adalah salah satu tanda kerusakan jantung (Muhsi *et al.*, 2020).

Menurut pengamatan histopatologi organ jantung Muhsi *et al.*, (2020) pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) dapat dilakukan pewarnaan dengan hematoksilin-eosin untuk mengamati kondisi sel jantung. Pada (Gambar 2) dapat dilihat histopatologi jantung pada tikus putih setelah diberi pewarna Hematoksilin Eosin (HE) dengan perbesaran 400x.

Penilaian kerusakan jantung menggunakan kriteria Dallas dilihat adanya infiltrasi sel radang dan nekrosis pada 5 lapang pandang (Mustofa *et al.*, 2021).



Gambar 2. Histopatologi jantung tikus putih segitiga hitam memperlihatkan infiltrasi sel radang, lingkaran hitam memperlihatkan nekrosis (Mustofa *et al.*, 2021)

Infiltrasi sel radang ditandai dengan mengecilnya sel pada jantung. Infiltrasi sel radang adalah reaksi dalam mengatasi agen asing yang masuk ke dalam tubuh (Berata *et al.*, 2019). Infiltrasi sel merupakan tanda adanya proses peradangan dimana proses tersebut akan menyebabkan kematian pada sel (Putra, 2019). Molekul radikal bebas dapat menyebabkan infiltrasi sel radang dan berpotensi mengalami kerusakan sel berupa apoptosis yang merupakan kematian sel terprogram dan nekrosis (Charisma *et al.*, 2021).

Nekrosis merupakan kematian sel pada jaringan akibat proses degenerasi yang bersifat irreversibel dimana proses kematian sel ini cenderung lebih cepat daripada proses regenerasinya. Sel yang mengalami nekrosis akan terlihat menggumpal pada jaringan (Nugraha *et al.*, 2021). Ciri utama sel mengalami nekrosis yaitu terjadinya piknosis, karyolisis, dan karyoheksis. Terjadinya nekrosis dapat disebabkan oleh suplai darah yang kurang, tidak ada inervasi saraf, suhu, trauma dan toksin (Muhsi *et al.*, 2020).

E. Limpa

Limpa adalah organ pertahanan pada tubuh dimana secara histologi limpa dari 2 bagian yaitu stroma yang terdiri dari kapsula dan trabekula, dan parenkim yang terdiri dari pulpa putih dan pulpa merah. Pulpa putih adalah sistem kekebalan untuk melawan infeksi dan pulpa merah berfungsi untuk membuang bahan-bahan yang tidak diperlukan dari dalam darah seperti sel darah merah yang rusak. Pulpa merah terdiri

dari sel sel plasma, makrofag, dan elemen darah sedangkan pulpa putih terdiri dari limfosit yang tersusun padat didalamnya dan arteri sentralis pada bagian tengahnya (Hidayati *et al.*, 2018).

Limpa berfungsi sebagai filtrasi darah dan mengkoordinasi respon imun (Hidayati *et al.*, 2018). Fungsi utama limpa yaitu menyaring berbagai antigen atau patogen asing yang ditemukan dalam darah. Pada bagian parenkim limpa terdapat germinal center sebagai tempat berkumpulnya sel limfosit dimana tingkat proliferasi sel limfosit B mempengaruhi diameter germinal center, sehingga terjadinya peningkatan diameter germinal center akan sama pada peningkatan imunitas spesifik (Wulandari Rousdy *et al.*, 2017).

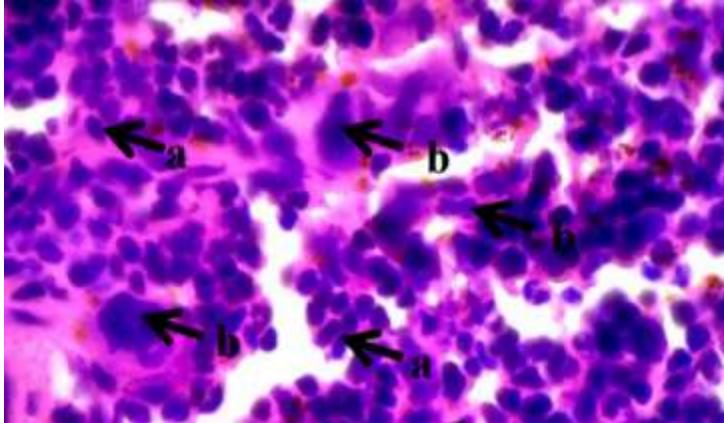
Limpa tikus memiliki berat sekitar 0,2% dari BB; dengan berat organ limpa tikus jantan normal yaitu 0,72-1,10 gram (Hidayah *et al.*, 2022). Gambaran makroanatomi limpa normal menurut Wulandari Rousdy *et al.*, (2017) adalah berbentuk mirip sepatu yang berwarna merah cerah, rata pada bagian tepi serta tidak terlihat nodul limfoid atau pulpa putih yang membesar pada permukaannya. Limpa berwarna merah dikarenakan banyaknya vaskularisasi pembuluh darah menuju bagian hilus pada limpa sedangkan jika organ limpa terlihat berwarna merah kehitaman artinya aliran darah menuju limpa terlalu besar.



Gambar 3. Makroanatomi limpa normal tikus putih (Wulandari *et al.*, 2016).

Berdasarkan penelitian histopatologi limpa Ma'shum (2020), kerusakan sel yang diamati yaitu nekrosis. Sel yang mengalami nekrosis dapat ditandai dengan terjadinya pembengkakan sel limfosit, sitoplasma yang pucat, inti sel yang memudar, fragmentasi inti sel, penyusutan inti sel dan bocornya membran sel (Elmore *et al.*, 2016). Hasil persen

nekrosis didapatkan dengan membandingkan jumlah sel limfosit yang mengalami nekrosis dengan sel limfosit normal. Sel limfosit pada limpa normal terdistribusi secara teratur dan ruang yang kosong akan diperlukan untuk pertumbuhan sel limfosit muda (Ma'shum, 2020).



Gambar 4. Mikroanatomi limpa tikus putih, (a) sel normal, (b) sel nekrosis (Ma'shum, 2020)

F. Landasan Teori

Miristisin memiliki aktivitas antidepresan pada dosis efektif 3 mg/kg BB mencit (Prajindra, 2021). Struktur miristisin mirip dengan amfetamin sehingga dapat menyebabkan minyak pala memiliki efek psikotropik atau bersifat halusinogen (Ismiyarto *et al.*, 2009).

Minyak pala dapat menyebabkan efek toksik yang disebabkan oleh miristisin dan *3-metoksi-4,5-metilendioksiamfetamina* serta *trimetoksiamfetamina* yang merupakan produk metabolit miristisin (Ismiyarto *et al.*, 2009). Miristisin adalah golongan fenilpropanoid, dianggap bersifat racun (Nichols, 2004; Liunokas, 2019) jika dosis berlebihan (Suprihatin *et al.*, 2007), dan uji toksisitas akut menimbulkan kematian dengan dosis diperkirakan lebih dari 2000 mg/Kg BB mencit (Prasidya, 2022). Dalam menentukan potensi efek toksik miristisin yang tidak terdeteksi pada uji toksisitas akut dan setelah mengkonsumsi miristisin secara berulang pada jangka waktu tertentu maka dilakukan uji toksisitas subkronis oral selama 28 hari dengan dosis miristisin pada tikus yaitu 2,1 mg/kg BB; 27,3 mg/kg BB; 354,9 mg/kg BB. Data yang dikumpulkan adalah tolok ukur kualitatif (gejala klinis dan pemeriksaan makropatologi) dan tolok ukur toksisitas kuantitatif (bobot organ, histopatologi organ jantung dan limpa).

G. Hipotesis

Miristisin dapat menimbulkan efek toksik subkronis terhadap organ jantung dan limpa tikus putih (*Rattus novergicus*) setelah 28 hari pemberian.

Dosis 354,9 mg/kg BB tikus diperkirakan dapat menimbulkan efek toksik subkronis terhadap organ jantung dan limpa tikus putih (*Rattus novergicus*) setelah 28 hari pemberian.