

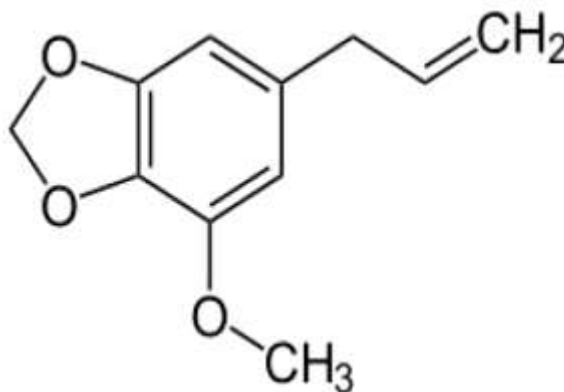
BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Miristisin

1. Deskripsi

Miristisin merupakan cairan berwarna kuning bening, beraroma khas biji pala, dan memiliki berat jenis sebesar 0,93 g/mL. Kelarutan miristisin larut dalam etanol, kloroform, dan eter, tidak larut dalam air (Ansory *et al.*, 2015).

Miristisin (1-Allyl-3-methoxy-4,5- methylenedioxy benzene) memiliki berat molekul sebesar 192,21 g/mol, titik didih 276,5°C, titik leleh kurang dari (- 20°C), indeks bias 1,5403 pada 20°C/D, dan tekanan uap 0,00646 mmHg (NCBI, 2023).



Gambar 1 Struktur Miristisin (Rahman *et al.*, 2015).

2. Isolasi Miristisin

Dalam penelitian (Souhoka *et al.*, 2018), isolasi minyak pala dari biji pala (*Myristica fragrans* Houtt) dilakukan dengan metode destilasi uap dan isolasi miristisin minyak pala dengan metode destilasi fraksinasi pengurangan tekanan. Selanjutnya dilakukan karakterisasi pada miristisin hasil isolasi menggunakan spektrofotometer GC, FTIR, ¹H-NMR, dan GC-MS. Hasil analisis dengan metode tersebut diperoleh data MS yang menunjukkan m/z = 192, sehingga dari hasil tersebut dapat dipastikan bahwa senyawa yang di isolasi dari minyak pala merupakan miristisin.

Berdasarkan penelitian (Suprihatin, S. Ketaren, S. Ngudiwaluyo, 1988), isolasi miristisin dengan pemekatan minyak pada suhu 145°C, dan tekanan 15 mmHg menghasilkan rendemen 6,72%, kadar miristisin diperoleh sebesar 70,10% dan konsentrasi sebesar 786,99 gram / liter. Kemudian dilakukan pemurnian lanjutan menggunakan metode

penyulingan selama 3 jam pada tekanan normal menghasilkan rendemen sebanyak $83,25 \pm 0,16\%$ dan kadar miristisin didapatkan 84,4% dengan konsentrasi sebesar 916,25 gram / liter. Pada penelitian ini sampel miristisin yang digunakan merupakan hasil isolasi dengan metode destilasi dengan kemurnian 92,13%.

3. Sampel miristisin yang digunakan

Sampel miristisin yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari penelitian (Ansory *et al.*, 2020) yang telah dianalisis menggunakan kromatografi GC-MS, IR, HNMR dengan kemurnian 92,13 %.

Analisis struktur miristin dengan ¹H-NMR menunjukkan hasil pergeseran kimia: 3,28 ppm (m, -CH₂-), 3,87 6 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) (Ansory *et al.*, 2020).

B. Toksisitas Subkronik

1. Pengertian Uji Toksisitas

Uji toksisitas merupakan uji yang digunakan untuk mengetahui ketoksikan suatu zat pada sistem biologi dan untuk mendapatkan data dosis respon yang khas dari sediaan uji. Data yang didapatkan bisa digunakan untuk menyampaikan informasi mengenai derajat bahaya sediaan uji jika terjadi paparan pada manusia, sehingga dapat ditetapkan dosis penggunaannya untuk keamanan pada manusia. Pengujian digunakan hewan uji sebagai model untuk mengetahui adanya reaksi biokimia, fisiologik, dan patologik pada manusia terhadap sediaan uji (BPOM, 2022).

Faktor yang dapat menentukan validitas hasil uji toksisitas secara in vivo diantaranya pemilihan spesies hewan uji, jumlah hewan dan galur, berat badan dan umur hewan, jenis kelamin, cara pemberian sediaan uji, pemilihan dosis uji, efek samping sediaan uji, prosedur dan teknik pengujian termasuk cara penanganan hewan selama percobaan. Berdasarkan waktu pengujian, uji toksisitas dibedakan menjadi 3, yaitu uji toksisitas akut, uji toksisitas subkronis, dan uji toksisitas kronis (BPOM, 2022).

2. Pengertian Uji Toksisitas Subkronis

Uji toksisitas subkronis oral merupakan suatu percobaan yang digunakan untuk mendeteksi efek toksik yang timbul setelah pemberian sediaan uji dengan dosis berulang dan diberikan secara oral terhadap hewan uji dengan waktu selama sebagian umur hewan, dan tidak lebih dari 10% semua umur hewan. Prinsip uji toksisitas subkronis oral yaitu

sediaan uji dalam dosis bertingkat dan diberikan setiap hari pada kelompok hewan uji dengan satu dosis per kelompok selama 14 hari, 28 hari, atau 90 hari, dan ditambahkan kelompok satelit untuk mengetahui adanya efek tertunda atau bersifat reversibel. Selama pemberian sediaan uji, setiap hari hewan uji diamati untuk menentukan adanya toksisitas. Hewan yang mati selama waktu pemberian sediaan uji, jika belum melewati rigor mortis atau kaku segera di nekropsi, dan diamati organ beserta jaringannya secara makropatologi dan histopatologi. Pada hari akhir pemberian sediaan uji, semua hewan uji yang masih hidup di nekropsi dan dilakukan pengamatan secara makropatologi pada setiap organ dan jaringannya, pemeriksaan hematologi, biokimia klinis dan histopatologi.

Tujuan uji toksisitas subkronis oral untuk memperoleh informasi adanya efek toksik zat yang tidak terdeteksi pada uji toksisitas akut, informasi kemungkinan adanya efek toksik setelah paparan sediaan uji secara berulang dalam jangka waktu tertentu, informasi dosis yang tidak menimbulkan efek toksik (*No Observed Adverse Effect Level / NOAEL*), dan mempelajari adanya efek kumulatif dan efek reversibilitas dari zat yang digunakan tersebut. Uji toksisitas subkronis terbagi menjadi 3 jenis antara lain yang pertama uji toksisitas singkat oral 14 hari pada rodensia, yang merupakan uji toksisitas yang digunakan untuk mengetahui sediaan uji dengan penggunaannya secara klinis dalam bentuk sekali pakai atau berulang dalam rentang waktu kurang dari 3 hari.

Uji toksisitas subkronis singkat oral 28 hari pada rodensia, yang digunakan untuk menguji sediaan uji dengan lama penggunaan secara klinis dalam bentuk sekali pakai atau berulang dalam waktu kurang dari 7 hari. Batas dosis uji untuk uji toksisitas subkronis singkat oral selama 28 hari jika dosis 1000 mg/kg BB tidak menunjukkan efek toksik, maka dosis tidak perlu dinaikkan, meskipun dosis yang diharapkan pada manusia belum tercapai. Untuk keentuan dosis pada pengujian toksisitas subkronis ini minimal digunakan 3 kelompok dosis yang tidak sama, 1 kelompok kontrol dan 2 kelompok satelit yang meliputi kelompok kontrol dan kelompok tertinggi. Jika diperlukan untuk mengontrol terjadinya toksisitas pada waktu interim, maka dapat ditambahkan kelompok interim. Dosis sediaan uji tertinggi harus menimbulkan efek toksik tetapi tidak memicu kematian atau adanya gejala toksisitas yang berat pada hewan uji, dosis menengah menimbulkan gejala toksik ringan, dan dosis yang paling rendah tidak

menimbulkan gejala toksik atau dikenal dengan *No Observed Adverse Effect Level* (NOAEL) (BPOM, 2022).

C. Hewan Uji

Jenis hewan uji yang digunakan pada pengujian toksisitas pada prinsipnya harus mempertimbangkan berdasarkan kepekaan, sistem metabolisme sediaan uji yang sesuai dengan manusia, kecepatan tumbuh, dan mudah atau tidaknya cara penanganan selama dilakukan penelitian (BPOM RI, 2020).

1. Deskripsi Tikus

Klasifikasi tikus putih (*Rattus novergicus*) menurut (Akbar, 2010) sebagai berikut :

Filum	: Chordata
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Keluarga	: Muridae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus novergicus</i>

Tikus putih Wistar merupakan salah satu hewan uji coba yang paling banyak digunakan sebagai model pada penelitian biomedik (Johnson, 2012).

2. Pemilihan dan Pengelompokan Hewan Uji

Hewan uji yang disarankan untuk pengujian toksisitas subkronis oral yaitu rodensia tikus putih galur Sprague Dawley atau Wistar, atau dapat menggunakan hewan rodensia lain dengan disertai justifikasi. Kriteria hewan uji yang akan digunakan dalam pengujian meliputi sehat, umur 6 – 8 minggu, untuk hewan uji betina harus tidak sedang bunting dan belum pernah beranak, sebelum dilakukan percobaan hewan uji diaklimatisasi di dalam ruang pengujian selama 5 – 7 hari. Pengelompokan hewan uji dilakukan secara acak sehingga persebaran berat badan merata untuk keseluruhan kelompok uji dan dengan variasi berat badan tidak lebih dari 20% dari rata – rata berat badan. Pengelompokan hewan uji dapat dilakukan dengan kelompok kontrol minimal 10 ekor hewan uji (5 jantan dan 5 betina), kelompok perlakuan sekurang – kurangnya 3 tingkat dosis masing – masing minimal 10 ekor hewan uji (5 jantan dan 5 betina), kelompok satelit yang mencakup kelompok kontrol dan kelompok dosis tertinggi masing – masing minimal 10 ekor hewan uji (5 jantan dan 5 betina). Jika diperlukan kelompok interim, maka hewan uji di euthanasia sebelum uji selesai

masing – masing 3 ekor jantan dan per kelompok kontrol untuk kelompok kontrol dan kelompok perlakuan (BPOM, 2022).

3. Pemeliharaan Hewan Uji

Ruang uji yang digunakan untuk percobaan harus memenuhi persyaratan suhu kelembapan, kebisingan dan pencahayaan yang sesuai dengan kebutuhan hidup hewan uji. Suhu ruang diatur menjadi $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, dengan kelembapan relatif 30% – 70%, dan penerangan 12 jam terang 12 jam gelap. Kebersihan ruang uji harus selalu dijaga. Hewan uji diberi pakan dan minum yang sesuai dengan standar laboratorium dan diberikan ad libitum kecuali jika tujuan penelitian yang memerlukan pakan khusus atau pembatasan asupan pangan. Hewan uji dipelihara dalam kandang yang terbuat dari material yang kedap air, kuat, mudah dibersihkan secara berkala, dan ruang pemeliharaan harus bebas dari kebisingan. Luas area kandang mengacu pada *Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* oleh *National Research Council Amerika Serikat* tahun 2011 untuk luas kandang tikus minimal 150 cm^2 dan tinggi kandang minimal 18 cm (BPOM, 2022).

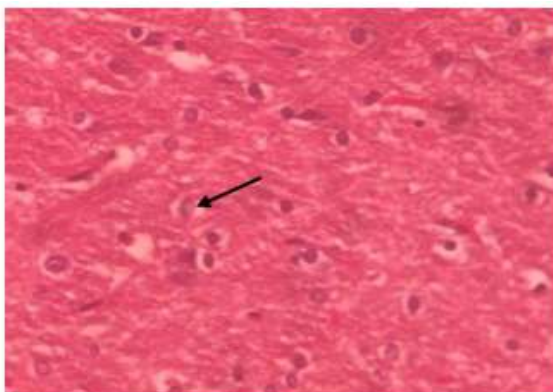
4. Organ Yang Diamati

Pada penelitian uji toksisitas subkronis ini dilakukan penamatan histopatologi organ tikus putih (*Rattus norvegicus*) yaitu otak dan pankreas.

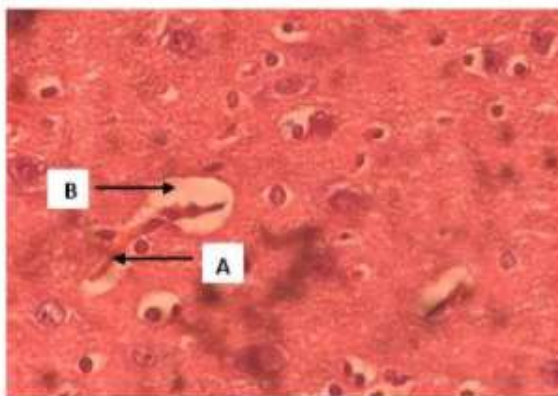
4.1 Otak. Otak adalah bagian susunan saraf pusat yang terletak pada cavum cranii, dilanjutkan dengan medulla spinalis setelah melewati foramen magnum. Anatomi otak pada tikus memiliki dua bagian utama, yaitu cerebrum atau otak besar dan cerebellum atau otak kecil. Cerebrum berfungsi sebagai pengatur pikiran, gerakan, berkembangnya kecerdasan, ingatan, kesadaran, pertimbangan, dan seluruh aktivitas mental. Cerebellum berfungsi sebagai sensor dari input – input yang diterima oleh cerebrum. Output dari sensor yang dikerjakan oleh cerebellum yaitu membantu mengkoordinasi sinyal motorik yang memiliki tanggung jawab sebagai pemelihara postur tubuh dan gerakan anggota tubuh secara tepat (Yustisia *et al.*, 2020).

Pemeriksaan histopatologi kerusakan pada otak tikus meliputi kongesti dan edema. Hasil pengamatan histopatologi organ tikus selanjutnya diberi skor sebagai berikut : diberi skor 0 jika tidak terdapat kongesti, 1 jika terdapat kongesti bersifat ringan, 2 jika terdapat kongesti bersifat sedang, 3 jika terdapat kongesti bersifat berat. Lesi edema pada otak diberi skor 0 jika tidak terdapat edema, 1 jika terdapat edema

bersifat ringan, 2 jika terdapat edema bersifat berat. (Yustisia *et al.*, 2020).



Gambar 2 Histopatologi otak tikus normal (Yustisia *et al.*, 2020).

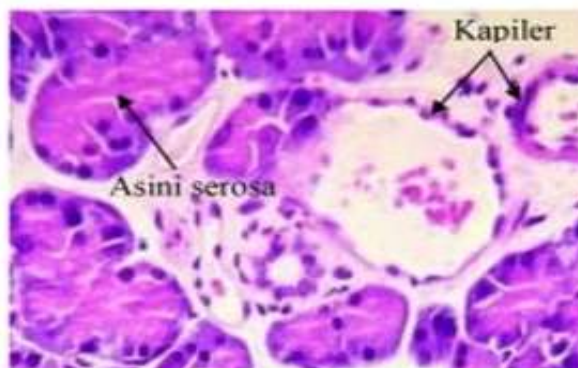


Gambar 3 Histopatologi otak tikus. Terlihat adanya lesi kongesti (A), dan terdapat edema (B) (Yustisia *et al.*, 2020).

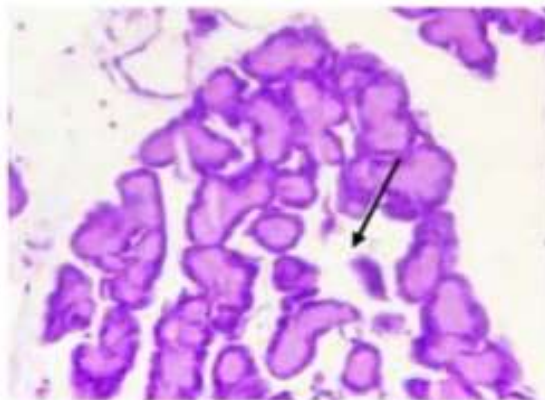
4.2 Pankreas. Berat organ pankreas tikus pada saat lahir sekitar 5-10 mg dan ukuran relatifnya yaitu 3 - 3,8 mg/g berat badan (Williams, 2017). Pankreas merupakan organ kelenjar majemuk terdiri atas jaringan eksokrin yang menghasilkan enzim amilase, peptidase, dan lipase. Jaringan endokrin yang terdapat pada pankreas menghasilkan hormon-hormon pada pulau langerhans sel beta (insulin), sel alfa (glucagon), dan sel delta (somatostatin) (Uray, 2009). Perubahan histopatologis pada pulau langerhans atau disebut juga unit endokrin dapat terjadi secara kuantitatif yaitu pengurangan jumlah atau ukuran, ataupun terjadi secara kualitatif yaitu terjadinya nekrosis atau kematian sel, atropi atau pengecilan sel, edema, dan fibrinosis atau terjadinya kerusakan sel pada jaringan (Tandi *et al.*, 2020).

Kerusakan pada pankreas tikus dilihat dengan adanya edema dan infiltrasi leukosit pada jaringan. Hasil pengamatan histopatologi pada organ pankreas dilakukan penilaian menggunakan scoring. Dimana skor

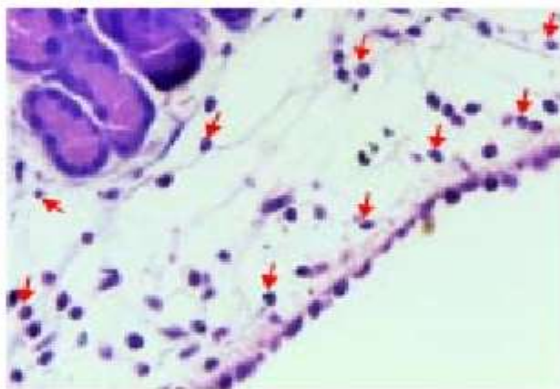
0 jika tidak terdapat edema, 1 jika terdapat edema ringan, 2 jika terdapat edema sedang, dan 3 jika terdapat edema berat. Skor penilaian pada infiltrasi leukosit sama seperti penilaian edema, dimana 0 jika tidak terdapat infiltrasi leukosit, 1 jika terdapat infiltrasi leukosit ringan, 2 jika terdapat infiltrasi leukosit sedang, 3 jika terdapat infiltrasi leukosit padat. Vakuolisasi diamati berdasarkan waktu. (Rosiana *et al.*, 2019).



Gambar 4 Histopatologi pankreas tikus normal (Rosiana *et al.*, 2019)



Gambar 5 Histopatologi pankreas tikus terdapat edema (Rosiana *et al.*, 2019).



Gambar 6 Histopatologi pankreas tikus terdapat infiltrasi leukosit (Rosiana *et al.*, 2019)

D. Landasan Teori

Pada penelitian Rahman (2015) menyebutkan bahwa konsumsi pala berlebihan dapat memberikan efek negatif bagi kesehatan yaitu dapat menyebabkan neurotoksisitas pada otak. Telah dilakukan penelitian toksisitas akut miristisin yang memperkirakan bahwa miristisin memiliki efek toksik ringan dan menimbulkan kematian dengan dosis lebih dari 2000 mg/kg BB mencit (Putri, 2022).

Konsumsi berlebihan biji pala (sesedikit satu setengah biji dan sampai 19 biji) dapat menyebabkan mengigau pingsan, dengan kombinasi rangsangan dan kantuk atau kelemahan yang mirip dengan opium dan lainnya narkotika. Keracunan juga dapat terjadi ketika individu mengonsumsi terlalu banyak biji pala sebagai obat rumahan. Karena pada tanaman dan rempah-rempah yang mengandung miristisin salah satu dari banyaknya komponen, sulit untuk menggambarkan respons toksikologi yang spesifik dari senyawa miristisin (NTP *et al.*, 2019).

Pengujian toksisitas pada hewan uji dilakukan sebagai salah satu bukti yang digunakan untuk mendukung keamanan suatu sediaan uji. Pemilihan jenis pengujian disesuaikan dari tujuan penggunaan suatu zat dan kemungkinan terjadinya resiko akibat paparan pada manusia (BPOM RI, 2020).

E. Hipotesis

Pertama, senyawa miristisin dapat menimbulkan efek toksik yang berpengaruh terhadap organ otak dan pankreas tikus putih (*Rattus novergicus*).

Kedua, miristisin diperkirakan dapat menimbulkan efek toksik pada tikus putih (*Rattus novergicus*) pada dosis 354,9 mg/kg BB tikus.

F. Kerangka Pikir

