

1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Pala (*Myristica fragrans* Houtt.) berasal dari Kepulauan Maluku, Indonesia. Pala (*Myristica fragrans* Houtt.) memiliki aroma khas serta rasa hangat, dan sedikit manis (Periasamy *et al.*, 2016). Salah satu komponen aktif dalam biji pala adalah oleoresin.

Oleoresin dapat diperoleh dengan cara diekstraksi menggunakan pelarut organik seperti etanol (Utomo dan Suherman, 2003). Pelarut etanol merupakan pelarut yang aman digunakan dalam dalam pengolahan pangan (BPOM, 2017). Metode yang digunakan untuk ekstraksi adalah metode *ultrasound-assisted extraction* (UAE). UAE dapat meningkatkan efisiensi proses dan hasil ekstraksi (Morsy, 2016; Chemat *et al.*, 2017). Oleoresin bersifat mudah teroksidasi akibat udara, cahaya, dan air, maka perlu dilakukan proses enkapsulasi yang bertujuan untuk melindungi bahan aktif agar tidak mudah teroksidasi, sehingga dapat meningkatkan umur simpan (Rosenberg *et al.*, 1990).

Pada penelitian ini proses enkapsulasi dilakukan dengan metode *foam mat drying*. *Foam mat drying* merupakan metode pengeringan dengan membentuk busa yang stabil untuk memperluas permukaan sehingga mempercepat proses pengeringan (Venkatachalam *et al.*, 2014). Metode *foam mat drying* sesuai diaplikasikan pada bahan yang mengandung senyawa volatil dan senyawa yang sensitif pada suhu tinggi (Hardy *et al.*, 2015).

Maltodekstrin merupakan salah satu bahan penyalut utama yang sering digunakan dalam enkapsulasi (Reineccius, 1988 dalam Purnomo *et al.*, 2014). Namun, emulsi maltodekstrin kurang stabil, sehingga kemampuannya dalam menyalut oleoresin rendah maka dibutuhkan bahan pengemulsi agar bahan inti dapat tersalut sempurna

(Anwar *et al.*, 2010). Pada penelitian ini, maltodekstrin dikombinasikan dengan tween 80 untuk menstabilkan emulsi (Sarungallo, 2019).

Oleoresin digunakan sebagai obat tradisional untuk mengatasi perut kembung dan merangsang nafsu makan (Nadkarni, 1988 dalam Jaiswal, 2009). Komponen aktif dalam oleoresin yaitu *myristicin* diketahui memiliki aktivitas antioksidan dan bersifat hepatoprotektif (Morita *et al.*, 2003), namun memiliki efek sedatif (Jaiswal, 2009) yang apabila digunakan secara berlebihan dapat menyebabkan sakit kepala dan mual (Ruslan, 2008). Ekstrak oleoresin biji pala mempunyai potensi yang baik untuk diaplikasikan di industri pangan sebagai bumbu untuk menambah cita rasa dan aroma dalam pembuatan sup, produk *bakery*, dan pembuatan puding (Peter, 2012), serta dapat dicampurkan ke dalam teh, minuman ringan, susu, maupun alkohol (Jaiswal, 2009), namun perlu diperhatikan keamanannya bila dikonsumsi. Uji toksisitas adalah uji yang dilakukan untuk mengetahui efek toksik serta perkiraan batas dosis penggunaan yang aman untuk dikonsumsi pada suatu bahan atau sediaan dan data yang (BPOM, 2014). Sampai saat ini belum ada penelitian mengenai studi toksisitas enkapsulat oleoresin biji pala. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan uji toksisitas akut oral enkapsulat oleoresin biji pala menggunakan metode OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*) *fix dose procedure* pada mencit betina galur Swiss.

1.2. Tinjauan Pustaka

1.2.1. Pala (*Myristica fragrans* Houtt.)



Gambar 1. 1 Pala (*Myristica fragrans*)

(<http://www.celkau.in/Crops/Spices/Nutmeg/nutmeg.aspx>)

Pala (*Myristica fragrans* Houtt.) adalah salah satu rempah yang berasal dari Kepulauan Maluku, Indonesia. Pala (*Myristica fragrans* Houtt.) memiliki aroma khas serta rasa hangat, dan sedikit manis (Periasamy *et al.*, 2016). Klasifikasi pala (*Myristica fragrans* Houtt.) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Sub kingdom	: Tracheobionta
Super divisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Sub kelas	: Magnoliidae
Ordo	: Magnoliales
Famili	: Myristicaceae
Genus	: <i>Myristica</i> Gronov.
Spesies	: <i>Myristica fragrans</i> Houtt

(USDA, <https://plants.usda.gov/home/plantProfile?symbol=MYFR3>).

Pala (*Myristica fragrans* Houtt.) berasal dari Kepulauan Maluku, Indonesia, dan pembudidayaannya meluas hingga Sumatra. Menurut daerah asalnya, Pala (*Myristica fragrans* Houtt.) dikenal dengan sebutan “*East Indian Nutmegs*” yang berasal dari Indonesia (Utomo dan Suherman, 2003).

Pala dapat tumbuh dengan baik di daerah terbuka, dengan ketinggian 500-700 m di atas permukaan laut, tanah gembur pH 5,5-6,5, temperatur 20-30°C, serta curah hujan teratur sepanjang tahun (Utomo dan Suherman, 2003). Buah pala berbentuk bulat, berwarna kuning, jika sudah masak, buah akan terbelah menjadi dua bagian, daging buah tebal dan rasanya asam (Utomo dan Suherman, 2003). Biji buah berbentuk agak bulat dengan diameter 2,5 cm. Kulit biji pala berwarna coklat agak kehitaman dan mengkilap (Utomo dan Suherman, 2003).

1.2.2. Oleoresin

Oleoresin adalah hasil olahan rempah yang diperoleh dari proses ekstraksi dengan pelarut organik (Utomo dan Suherman, 2003). Pelarut organik yang aman digunakan dalam pengolahan pangan adalah etanol (BPOM, 2017). Oleoresin dalam pengolahan pangan digunakan sebagai bumbu untuk menambah cita rasa dan aroma dalam pembuatan sup, produk *bakery*, dan pembuatan puding (Peter, 2012). Kandungan kimia pala (*Myristica fragrans*) terdiri dari turunan alkil benzena (*myristicin*, *elemicin*) yang memiliki aktivitas antioksidan, senyawa utama *myristicin* memiliki aktivitas hepatoprotektif (Morita *et al.*, 2003). *Alpha-pinene*, *beta-pinene*, *myrcene*, *eugenol*, dan *isoeugenol* yang memiliki aktivitas antioksidan (Gupta, 2013). Selain itu terdapat kandungan *terpene hydrocarbons* (*sabine* dan *pinene*), *trimyristin*, *camphene*, *tarpinene*, *myrcene*, *phellandrene*, *camphene*, *pcymene*, dan turunan terpen lainnya (Nagja *et al.*, 2016).

Terdapat beberapa penelitian untuk mengetahui komponen oleoresin pala menggunakan GC-MS, dapat dilihat pada Tabel 1.1.

Tabel 1. 1. Penelitian Komponen Oleoresin Biji Pala menggunakan GC-MS

Asal Biji Pala	Pelarut	Metode Ekstraksi	Jumlah Komponen	Komponen Terbesar	Sumber
Ternate, Maluku Utara (5-6 bulan), panen bulan Juli 2009	Etanol 96% (1 : 5)	Maserasi suhu 4°C	22	Myristicin (33,81%), Trans-isoelimicin (17,00%), Benzaldehyde (6,29%), Methoxyeugenol (5,89%), Cyclohexen (5,47%)	Rodianawati (2010)
		Maserasi suhu 40°C	15	Myristicin (38,24%), Trans-isoelimicin (19,79%), Methoxyeugenol (6,66%), Cyclohexen (6,37%), Trans- α -bergamotene (5,22%)	
		Destilasi-Maserasi suhu 40°C	19	Sabinene (43,42%), α -pinene (13,27%), β -pinene (9,95%), Myristicin (6,77%), Limonene (5,78%)	
Marikurubu, Ternate, Maluku Utara (7-9 bulan)	Etanol 96% (1 : 5)	Maserasi suhu 4°C	39	Methyl-eugenol (33,40%), Myristicin (10,90%), Cis-methyl isoeugenol (9,09%), Elemicin (8,33%), Isocoumarin (5,61%)	Assagaf <i>et al</i> (2012)
		Destilasi-Maserasi 4°C	48	Myristicine (18,51%), methyl-eugenol (15,75%), Elemicin (15,62%), Isocoumarin (8,77%), Myristic acid (6,61%)	
Ternate, Maluku Utara (5-6 bulan)	Etanol 96% (1 : 5)	Destilasi-Maserasi suhu 40°C	24	Sabinene (41,21%), α -pinene (11,36%), β -pinene (9,98%), Myristicin (5,46%)	Rodianawati <i>et al</i> (2015)

Asal Biji Pala	Pelarut	Metode Ekstraksi	Jumlah Komponen	Komponen Terbesar	Sumber
Grenada, Amerika Utara	Etanol 50% (1:20)	UAE	8	Isoelemicin (62,24%), 1,1-dimethyl-2-[(1E)-3-methylbuta-1,3-dienyl cyclopropane (8,4%)	Matulyte <i>et al</i> (2019)
	Etanol 70% (1:20)		15	1,1-dimethyl-2-[(1E)-3-methylbuta-1,3-dienyl cyclopropane (29,99%), Isoelemicin (23,63), α -pinene (8,3%), 4-carene, trans -(+)-(6,56%), Cis-p-ment-2-en-1-ol (5,88%)	
	Etanol 96% (1:20)		13	1,1-dimethyl-2-[(1E)-3-methylbuta-1,3-dienyl cyclopropane (47,32%), α -pinene (14,67%), 4-carene, trans -(+)-(13,22%)	
Desa Tanah Rata, Banda, Maluku Tengah (6 bulan)	Etanol 96% (1:4)	UAE	49 – 54	Asam miristat (22,39-26,97%), <i>N</i> -4 methylphenol 2 Hydroxymino acetamide (12,77-19,02%), Myristicin (10,11-11,93%), Licarin A (7,66-8,89%)	Budiastra I. W <i>et al</i> (2020)
		Maserasi	31	Asam miristat (27,25%), <i>N</i> -4 methylphenol 2 Hydroxymino acetamide (21,16%), Myristicin (12,46%), Licarin A (9,81%)	
Jatingaleh, Semarang, Jawa Tengah	Etanol 96% (1 : 10)	UAE	20	1,3-benzodioxole, 5-(2-propenyl) (39,80%), Adamantane-1-carboxylic acid (2-methyl-4-thiocyanatophenyl)-amide (16,06%; 7,26%), 3-cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl) (8,56%)	Rahardjo (2020)

1.2.3. *Ultrasound-assisted extraction (UAE)*

Ekstraksi merupakan proses pemisahan zat aktif simplisia nabati atau hewani dengan menggunakan pelarut (BPPT, 2017). Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dari proses ekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai (Depkes RI, 2014).

Metode yang digunakan untuk ekstraksi adalah metode *ultrasound-assisted extraction* (UAE) yang dapat meningkatkan efisiensi proses dan hasil ekstraksi dalam waktu singkat (Morsy, 2016; Chemat *et al.*, 2017). Prinsip UAE adalah menghasilkan gelombang ultrasonik yang dapat memecah dinding sel sehingga membuat pelarut mudah meresap ke dalam sel untuk mengekstrak senyawa yang diinginkan (Sharmila *et al.*, 2019).

1.2.4. **Enkapsulasi**

Enkapsulasi adalah proses penyalutan bahan-bahan inti berbentuk cair atau padat dengan menggunakan bahan penyalut khusus yang bertujuan untuk melindungi bahan aktif dari pengaruh udara, cahaya, dan air yang dapat menyebabkan oksidasi, sehingga dapat meningkatkan umur simpan (Rosenberg *et al.*, 1990).

Maltodekstrin merupakan salah satu bahan penyalut utama yang sering digunakan dalam enkapsulasi (Reineccius, 1988 dalam Purnomo *et al.*, 2014). Maltodekstrin memiliki rasa dan aroma yang netral, bersifat mudah larut air, sedikit larut dalam etanol 95%, dan kelarutannya akan meningkat seiring dengan kenaikan DE (*Dextrose Equivalent*) (Rowe *et al.*, 2009). Maltodekstrin memiliki tingkat higroskopis dan *browning* yang rendah (Fitriana *et al.*, 2014). Namun, emulsi maltodekstrin kurang stabil, sehingga kemampuannya terhadap pemerangkapan oleoresin rendah sehingga dibutuhkan bahan pengemulsi agar bahan inti dapat tersalut sempurna (Anwar *et al.*, 2010).

Kombinasi maltodekstrin dan tween 80 dapat digunakan sebagai bahan penyalut bumbu herbal dengan karakteristik fisikokimia yang baik (Mayasari *et al.*, 2019). Penggunaan kombinasi maltodekstrin dan tween 80 pada metode pengeringan *foam mat drying* dapat menghasilkan bahan yang berkualitas dari segi nutrisi dan pemerian (Ramadhia *et al.*, 2010). Tween 80 merupakan salah satu bahan pengemulsi yang stabil dan non toksik (Rowe *et al.*, 2009). Tween 80 adalah cairan seperti minyak berwarna kuning muda, bau khas, rasa pahit dan hangat. Tween 80 digunakan sebagai pengemulsi dengan konsentrasi 1 – 15% (Rowe *et al.*, 2009).

1.2.5. *Foam Mat Drying*

Foam mat drying merupakan metode pengeringan dengan membentuk busa yang stabil untuk meningkatkan luas permukaan sehingga mempercepat proses pengeringan. Pengeringan dilakukan dengan membentuk lapisan tipis pada suhu rendah (Venkatachalam *et al.*, 2014). Metode *foam mat drying* merupakan metode yang sederhana, murah, dan menggunakan suhu relatif rendah. Metode *foam mat drying* sesuai diaplikasikan pada bahan yang mengandung senyawa volatil dan senyawa yang sensitif pada suhu tinggi (Hardy *et al.*, 2015). Metode *foam mat drying* dapat menghasilkan kadar air lebih rendah dan kandungan antioksidan lebih tinggi dibandingkan dengan *spray drying* (Cahyadi, 2017).

Pembentukan busa yang stabil dilakukan dengan menambahkan bahan *foaming* dan *stabilizer* (Iqbal *et al.*, 2018). Salah satu bahan *foaming* adalah Tween 80, yang merupakan emulsi yang stabil dan banyak digunakan untuk produk makanan (Rowe *et al.*, 2009). Penggunaan Tween 80 sebagai *foaming agent* dapat menghasilkan produk dengan kadar air yang lebih rendah (Hariyadi, 2019). Konsentrasi tween 80 yang tinggi menghasilkan lebih banyak busa dan dapat mempercepat proses pengeringan, sehingga dapat menghasilkan kadar air yang rendah pada lama waktu pengeringan yang sama (Mayasari *et al.*, 2019). Tween 80 adalah cairan berminyak warna kuning pada suhu 25°C, memiliki bau khas, rasa hangat, agak pahit, berwarna kekuningan (Rowe *et al.*, 2009). Jumlah maksimal tween 80 yang dapat dikonsumsi

setiap hari tanpa menimbulkan efek yang dapat merugikan kesehatan adalah 25 mg/kgBB (BPOM, 2019).

1.2.6. Uji Toksisitas

Uji toksisitas adalah uji yang dilakukan untuk mendeteksi efek toksik suatu zat sediaan uji (BPOM, 2014). Data yang diperoleh dapat digunakan untuk memberi informasi mengenai tingkat toksisitas sediaan uji, serta digunakan untuk penentuan dosis penggunaannya demi keamanan manusia (BPOM, 2014). Uji toksisitas dilakukan dengan menggunakan hewan uji sebagai model untuk melihat adanya reaksi biokimia, fisiologi dan patologi pada manusia terhadap suatu sediaan uji (BPOM, 2014).

Uji toksisitas akut oral adalah pengujian untuk mendeteksi efek toksik yang muncul dalam waktu singkat setelah pemberian sediaan uji secara oral dalam dosis tunggal, atau dosis berulang yang diberikan dalam waktu 24 jam (BPOM, 2014). Sediaan uji dalam beberapa tingkat dosis diberikan pada kelompok hewan uji dengan satu dosis per kelompok, kemudian dilakukan penelitian terhadap adanya efek toksik dan kematian (BPOM, 2014). Hewan yang mati selama percobaan dan yang hidup sampai akhir percobaan diotopsi untuk dievaluasi (BPOM, 2014).

Pengujian toksisitas menggunakan metode OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*), yaitu metode untuk pengujian toksisitas yang ditinjau secara berkala berdasarkan kemajuan ilmiah atau praktik penilaian yang berubah (OECD, 2001). Metode OECD meminimalkan jumlah hewan yang digunakan dan penentuan dosis telah dipertimbangkan. Metode OECD *Fixed Dose* digunakan untuk bahan uji dengan derajat toksisitas sedang dan dosis yang dipilih adalah dosis yang menyebabkan gejala toksik namun tidak menimbulkan kematian (BPOM, 2014). Prinsip metode OECD *Fixed Dose* adalah sekelompok hewan uji dengan jenis kelamin yang sama diberikan dosis bertingkat menggunakan metode *fixed doses* antara lain: 5, 50, 300 dan 2000 mg/kg (BPOM, 2014).

Pengujian toksisitas menggunakan hewan uji mencit. Mencit memiliki 99% kemiripan gen dengan manusia, selain itu mencit dapat berkembang biak dengan cepat, lebih mudah dalam pemeliharaan dan penanganannya, serta harganya relatif lebih murah (Stevani, 2016). Mencit betina lebih sering digunakan untuk uji toksisitas karena dapat memberikan respon toksik lebih cepat (Elya *et al.*, 2010; BPOM, 2014; Fadilah, 2019).

1.3. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui toksisitas akut enkapsulat oleoresin biji pala (*Myristica fragrans Houtt*) dengan menentukan nilai LD₅₀ serta pengaruh pemberian enkapsulat oleoresin biji pala (*Myristica fragrans Houtt*) terhadap histopatologi hepar pada mencit betina galur Swiss.

