

## 4. PEMBAHASAN

### 4.1. Ekstraksi

Ekstraksi oleoresin biji pala dilakukan dengan metode *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE) dengan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1 : 10, selama 37,5 menit, suhu 50°C, frekuensi 45 kHz, dan power 100 W, kemudian filtrat diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 40°C, kecepatan 52 rpm.

Pelarut yang digunakan adalah etanol 96%, yang merupakan pelarut yang aman digunakan dalam pengolahan pangan (BPOM, 2017). Metode yang digunakan adalah *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE), metode UAE dapat meningkatkan efisiensi proses dan hasil ekstraksi dalam waktu singkat cocok untuk senyawa oleoresin yang mudah menguap (Morsy, 2016; Chemat *et al.*, 2017). Proses ekstraksi dilakukan dengan perbandingan bubuk pala dan etanol 96% 1 : 10, selama 37,5 menit, dan suhu 50°C merupakan ratio, waktu, dan suhu optimal ekstraksi oleoresin biji pala (Rahardjo, 2019). Filtrat yang diperoleh diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 40°C, kecepatan 52 rpm hingga diperoleh ekstrak oleoresin biji pala. Ekstrak oleoresin biji pala yang telah diperoleh disimpan dalam botol kaca gelap tertutup rapat, dilapisi *aluminium foil*, dan disimpan di dalam *refrigerator* agar terlindung dari cahaya, suhu panas, dan tidak mudah teroksidasi (Konstantia, 2021).

### 4.2. Enkapsulasi

Ekstrak kental oleoresin biji pala kemudian dienkapsulasi dengan metode *foam-mat drying*. Metode *foam mat drying* sesuai dengan ekstrak oleoresin biji pala yang mengandung senyawa mudah menguap 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).

Kombinasi maltodekstrin dan tween 80 dapat digunakan sebagai bahan penyalut bumbu herbal dengan karakteristik fisikokimia yang baik (Mayasari *et al.*, 2019). Tween 80 memiliki stabilitas yang baik dan banyak digunakan untuk produk makanan (Rowe *et al.*, 2009). Maltodekstrin memiliki tingkat higroskopis dan *surface oil* yang rendah, serta *trapped oil* yang tinggi, yang menunjukkan banyaknya oleoresin yang terlapisi oleh enkapsulat sehingga lebih stabil terhadap cahaya dan oksigen (Konstantia, 2021).

Pengeringan dilakukan selama 24 jam pada suhu 50°C dalam oven *binder*, kemudian dihaluskan dan disimpan dalam botol kaca gelap tertutup rapat, dilapisi *aluminium foil* agar terlindung dari cahaya, udara, dan tidak mudah teroksidasi (Konstantia, 2021).

#### **4.3. Analisa GC-MS (*Gas Chromatography Mass Spectrometry*)**

Hasil analisa GC-MS ekstrak oleoresin biji pala menunjukkan senyawa tertinggi dalam ekstrak oleoresin biji pala adalah *myristicin*, lalu diikuti oleh *benzene,1,2-dimethoxy-4-(2-propenyl)-(CAS)* dengan nama lain *isoeugenol*, dan *phenol,2,6-dimethoxy-4-(2-propenyl)-(CAS)*. Terdapat pula senyawa *tetradecanoic acid, methyl ester (CAS)* dengan nama lain *myristic acid*, *1,3-benzodioxole,5-(2-propenyl)* dengan nama lain *safrole*, dan *9-octadecenoic acid (Z)-,methyl ester (CAS)* dengan nama lain *oleic acid*. Perbedaan asal, umur, jenis dan jumlah ekstraksi, serta metode dan lama waktu ekstraksi biji pala yang digunakan akan mempengaruhi jenis dan jumlah senyawa yang terkandung.

Hasil analisa GC-MS enkapsulat oleoresin biji pala menunjukkan senyawa tertinggi dalam enkapsulat oleoresin biji pala adalah *9-octadecenoic acid (Z)-,methyl ester (CAS)* dengan nama lain *oleic acid*, lalu diikuti *hexadecenoic acid, methyl ester (CAS)* dan *octadecanoic acid, methyl ester*. Terdapat pula senyawa *tetradecanoic acid, methyl ester (CAS)* dengan nama lain *myristic acid*, *1,3-benzodioxole,4-*

*methoxy-6(2-propenyl)-(CAS)* dengan nama lain *myristicin*, dan *benzene,1,2-dimethoxy-4-92-propenyl)-(CAS)* dengan nama lain *isoeugenol*.

Setelah proses enkapsulasi terdapat senyawa yang hilang dan terdapat senyawa baru yang terbentuk dapat dilihat di Tabel 4.1.

Tabel 4. 1. Senyawa yang Hilang dan Senyawa Baru yang Terbentuk Setelah Proses Enkapsulasi

Sampel Senyawa	Ekstrak Oleoresin Biji Pala	Enkapsulat Oleoresin Biji Pala
	<i>trans Sabine hydrate</i>	<i>Decanoic acid, methyl ester (CAS)</i>
	<i>Ether, p-menth-6-en-2-yl methyl</i>	<i>Dodecanoic acid, methyl ester</i>
	<i>3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)- (CAS)</i>	<i>n-Hexadecanoic acid</i>
	<i>3-Cyclohexene-1-methanol, .alpha.,4-trimethyl-, (S)- (CAS)</i>	<i>Heptane, 2,6-diphenyl-3-methyl-</i>
	<i>1,3-Benzodioxole, 5-(2-propenyl)-</i>	<i>Nonanoic acid, 9-(o-propylphenyl)-, methyl ester (CAS)</i>
	<i>Benzene, 1-methoxy-4-pentyl- (CAS)</i>	<i>Eicosanoic acid, methyl ester (CAS)</i>
	<i>.alpha.-Cubebene</i>	<i>Tricosanoic acid, methyl ester (CAS)</i>
	<i>Isoeugenol</i>	<i>1,2-Benzenedicarboxylic acid, 3-nitro- (CAS)</i>
	<i>.beta.-cadinene</i>	<i>16-Hentriacontanone (CAS)</i>
	<i>cis-Asarone</i>	<i>Cyclononasiloxane, octadecamethyl-</i>
	<i>1-Propanone, 1-(2,4-dimethoxyphenyl)-</i>	<i>Tetracosamethylcyclododecasiloxane</i>
	<i>Thiazolo [3,2-a]benzimidazole-3(2H)-one, 2-(2-fluorobenzylideno)-7,8-dimethyl-</i>	<i>Stigmast-5-en-3-ol, oleate</i>
	<i>2,4,7-Trimethylcarbazole</i>	<i>Hahnfett</i>
	<i>Phenol, 2,6-dimethoxy-4-(2-propenyl)-</i>	
	<i>1-Phosphacyclopent-2-ene, 1,2,3-triphenyl-5-dimethylmethylene</i>	
	<i>Desmethylnomifensine</i>	

Hal ini diduga karena adanya proses pemanasan selama 24 jam, sehingga beberapa senyawa hilang karena adanya penguapan, dan terbentuknya senyawa baru diduga karena adanya proses reaksi antar senyawa. Hasil analisa GC-MS ekstrak oleoresin biji pala terdapat senyawa *1,3-benzodioxole,5-(2-propenyl)* dengan nama lain *safrole* dengan luas area 3,37 %, namun pada hasil analisa GC-MS enkapsulat oleoresin biji pala senyawa *safrole* hilang, hal ini disebabkan adanya proses

pemanasan pada suhu 50°C selama 24 jam. *Safrole* bersifat mudah teroksidasi dan stabil pada suhu 2 - 8°C ([https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB4365927.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB4365927.htm)). *Safrole* merupakan senyawa karsinogenik, sehingga *safrole* dan minyak apapun yang mengandung *safrole* dilarang ditambahkan langsung ke dalam makanan (<https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/food-additive-status-list>).

Senyawa seperti *myristicin*, *myristic acid*, dan *oleic acid* masih tetap ada pada hasil analisa GC-MS enkapsulat oleoresin biji pala. *Myristicin* memiliki aktivitas antioksidan dan aktivitas hepatoprotektif (Morita *et al.*, 2003), juga digunakan sebagai *flavoring agents* pada pangan (PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Myristicin#section=Use-Classification>). *Myristic acid* dapat meningkatkan kadar asam lemak omega 3 (Verruck *et al.*, 2019), yang diketahui dapat menjaga kesehatan jantung, menurunkan resiko kanker, menjaga kesehatan mata dan otak (National Institutes of Health, 2020). *Myristic acid* merupakan senyawa yang aman untuk penggunaannya sebagai bahan tambahan penyedap makanan (Burdock dan Carabin, 2006). *Oleic acid* diketahui dapat meningkatkan aktivitas antioksidan (Hernandez, 2016).

#### 4.4. Uji Toksisitas Akut Oral

Penelitian tingkah laku dan gejala toksik dilakukan setiap 30 menit selama 4 jam pertama, selanjutnya sehari sekali selama 14 hari. Penelitian dilakukan pada berat badan, bulu, kulit, mata, ekor, pernapasan, dan cara berjalan, serta pada kondisi diare, gemetar/kejang, lemas, dan koma. Semua kelompok kontrol dan perlakuan tidak ada yang menunjukkan perubahan pada bulu, kulit, mata, ekor, pernapasan, dan cara berjalan, serta tidak terjadi diare, gemetar/kejang, lemas, dan koma yang menunjukkan bahwa tidak adanya gejala toksik.

Pada hasil penelitian berat badan mencit, terdapat penurunan dan peningkatan berat badan yang tidak stabil, hal ini diduga adanya faktor eksternal seperti stress akibat perlakuan yang diberikan dan aktivitas dari masing – masing mencit. Penurunan berat badan yang drastis pada hari kedua, diduga akibat adanya perlakuan pemberian treatment pada mencit, yang dapat mempengaruhi kondisi mencit, seperti hilangnya nafsu makan. Penurunan berat badan dapat menjadi indikator awal bahwa adanya kondisi yang memburuk (OECD, 2000).

#### 4.4.1. LD<sub>50</sub>

Pada penelitian ini uji toksisitas dilakukan dengan dosis tertinggi yaitu 2000 mg/kgBB, tidak terdapat adanya gejala toksik dan tidak terdapat kematian pada mencit sebagai hewan uji, sehingga perkiraan nilai LD<sub>50</sub> enkapsulat oleoresin biji pala adalah > 2000 mg/kgBB (BPOM, 2014). Menurut *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)*, LD<sub>50</sub> > 2000 mg/kgBB masuk dalam kategori toksisitas ringan tanpa tanda peringatan keamanan pada label (United Nations, 2011).

LD<sub>50</sub> enkapsulat oleoresin biji pala yang diperoleh dengan hewan uji mencit secara oral adalah > 2000 mg/kgBB, bila dikonversikan ke manusia diperoleh dosis 221,66 mg/kgBB dengan faktor konversi dari mencit (berat badan 20 gram) ke manusia (berat badan 70 kg) adalah 387,9 (Laurence dan Bacharach, 1964 dalam Amalina, 2009).

#### 4.4.2. Berat Organ Relatif

Organ hepar ditimbang untuk menghitung berat organ relatif yang merupakan parameter dasar untuk mengetahui apakah terdapat kerusakan pada organ atau tidak (Rajeh *et al*, 2011). Berat organ relatif hepar pada mencit berada dalam kisaran 3 – 5% (Roges dan Dintzis, 2018). Pada kelompok perlakuan P2 terdapat dua ekor mencit dengan berat organ relatif lebih dari 5% dan memiliki rata-rata berat organ

relatif tertinggi, hal ini menunjukkan adanya pengaruh pemberian sediaan uji dosis 50 mg/kgBB pada berat organ relatif hepar.

#### **4.4.3. Gambaran Makroskopis Organ Hepar**

Organ hati normal memiliki warna merah kecoklatan, permukaan licin, dan konsistensinya kenyal (Lumongga, 2008). Hasil penelitian gambaran makroskopis organ hepar tidak ditemukannya perubahan warna maupun tekstur dari organ hepar, hal ini menunjukkan bahwa enkapsulat oleoresin biji pala tidak mempengaruhi makroskopis organ hepar mencit.

#### **4.4.4. Gambaran Mikroskopis Organ Hepar**

Nilai perubahan gambaran mikroskopis organ hepar pada kelompok perlakuan lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol. Degenerasi dan nekrosis juga terjadi pada kelompok kontrol, hal ini disebabkan karena kerusakan maupun kematian sel dapat terjadi akibat adanya penuaan sel (Sriyanti, 2016). Kerusakan pada sel bersifat reversibel, sel dapat beradaptasi dan beregenerasi, namun bila berlangsung lama dan/atau terjadi secara terus menerus sel dapat mengalami kerusakan hingga kematian sel (Setyawan dan Yani, 2020).

Pada hasil skoring degenerasi sel pada kelompok P2 cukup tinggi, sehingga adanya kemungkinan berat organ relatif pada kelompok P2 tinggi disebabkan adanya degenerasi sel yang menyebabkan sel membengkak sehingga meningkatkan berat organ hepar.

Perubahan sel degenerasi parenkimatososa pada kelompok perlakuan mengalami peningkatan dari 23,00% (K) menjadi 40,40% (P1), 37,60% (P2), 39,00% (P3), dan 38,40% (P4). Perubahan sel degenerasi hidropik pada kelompok P2, P3, dan P4 mengalami peningkatan dari 8,60% (K) dan 10,20% (P1) menjadi 44,20% (P2), 36,00% (P3), dan 40,60% (P4). Perubahan sel nekrosis pada kelompok P2, P3, dan

P4 mengalami peningkatan dari 1,00% (K) dan 5,40% (P1) menjadi 14,20% (P2), 20,80% (P3), dan 14,80% (P4). Hal ini menunjukkan bahwa adanya pengaruh dosis pemberian pada perubahan gambaran mikroskopis organ hepar. Adanya perubahan yang terlihat pada gambaran mikroskopis organ hepar, namun tidak terlihat adanya perubahan pada gambaran makroskopis organ hepar, hal ini menunjukkan bahwa toksisitas awal ditunjukkan dengan adanya perubahan pada sel tetapi belum merubah peforma dari jaringan (Setyawan dan Yani, 2020). Sehingga perlu dilakukan uji toksisitas subkronis dan/atau kronis pada enkapsulat oleoresin biji pala (*Myristica fragrans* Houtt) untuk mengetahui efek toksik yang tidak terdeteksi pada uji toksisitas akut, serta efek jangka panjang yang dapat ditimbulkan dari enkapsulat oleoresin biji pala (*Myristica fragrans* Houtt).

