

Uji Toksisitas Akut Miristisin Terhadap Mencit Putih Betina (*Mus musculus*)

*Acute Toxicity Test of Myristicin on Female White Mice (*Mus musculus*)*

Clara Prasydia Maharani Putri, Hery Muhamad Ansory*, Inaratul Rizkhy Hanifah

Universitas Setia Budi Surakarta

Corresponding author: Hery Muhamad Ansory: Email: hery.ansory89@setiabudi.ac.id

Submitted: 18-01-2023

Revised: 03-04-2023

Accepted: 02-05-2024

ABSTRAK

Miristisin memiliki aktivitas antidepresan, antioksidan, dan antibakteri, namun sampai saat ini belum ada data ilmiah mengenai toksisitas dari senyawa miristisin. Uji toksisitas akut oral dilakukan untuk mendeteksi efek toksik yang muncul dalam waktu singkat setelah pemberian sediaan uji. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui toksisitas akut miristisin dari tanaman pala (*Myristica fragrans*) terhadap mencit putih betina (*Mus musculus*). Metode yang digunakan adalah *fixed dose* berdasarkan *Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD)*. Sampel pada penelitian ini adalah miristisin dari minyak pala dengan dosis 5, 50, 300 dan 2000 mg/kg BB. Hasil penelitian menunjukkan hingga dosis 2000 mg/kg BB tidak terdapat kematian namun pada dosis tersebut terdapat gejala toksisitas berupa *grooming*, lemas, dan nafas abnormal pada sebagian hewan uji sehingga miristisin dikatakan tidak toksik. Hasil analisis *paired t test* menunjukkan bahwa terdapat bermakna pada perubahan berat badan mencit antar kelompok pada hari pertama dan hari ke-3 pengamatan ($p < 0,05$) yang diduga karena berkurangnya nafsu makan.

Kata Kunci: miristisin; OECD; toksisitas akut

ABSTRACT

Myristicin has antidepressant, antioxidant and antibacterial activity, but until now, there has been no scientific data regarding the toxicity of myristicin compounds. Therefore, the acute oral toxicity test was carried out to detect toxic effects that appeared in a short time after administration of the test preparation. This study aimed to determine myristicin's acute toxicity from nutmeg (*Myristica fragrans*) to female white mice (*Mus musculus*). The method used is a fixed dose based on the Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD). The samples in this study were myristicin from nutmeg oil at doses of 5, 50, 300, and 2000 mg/kg BW. The results showed that up to a dose of 2000 mg/kg BW, there was no death, but at that dose, there were symptoms of toxicity such as grooming, weakness, and abnormal breathing in some test animals, so myristicin was said to be non-toxic. The results of the paired t-test analysis showed that there was a significant change in the weight of the mice between groups on the first and third days of observation ($p < 0.05$), which was thought to be due to reduced appetite.

Keywords: Acute toxicity; myristicin; OECD

PENDAHULUAN

Miristisin merupakan senyawa khas tanaman pala (*Myristica fragrans*) dengan dosis 3 mg/kg BB efektif memberikan efek antidepresan terhadap penurunan waktu imobilitas hewan uji (Prajindra, 2021). Miristisin memiliki aktivitas antioksidan dalam minyak atsiri pala dengan nilai IC_{50} sebesar 189 mg/L (Ansory *et al.*, 2020). Turunan miristisin kalkon diduga sebagai senyawa yang ampuh melawan target protein molekuler kanker kulit dengan cara *docking* molekuler (Ansory *et al.*, 2021). Minyak atsiri dapat diekstraksi dari biji tanaman pala dengan miristisin sebagai salah satu komponen utamanya dan mampu memberikan aktivitas antibakteri untuk bakteri *E. coli* dan bakteri *S. aureus* (Ansory *et al.*, 2018). Miristisin memiliki potensi besar untuk dieksplorasi dalam kedokteran untuk digunakan sebagai pengobatan klinis untuk patologi karena memiliki aktivitas sebagai antiinflamasi dan antiproliferatif (Seneme *et al.*, 2021).

Satu hingga tiga buah pala atau 5-30 gram biji pala dapat menimbulkan efek psikogenik, sedangkan bubuk pala minimal sebanyak 5 gram dianggap sebagai dosis toksik (Green, 1959). Stimulasi otak ringan pada otak manusia yang disebabkan oleh 400 mg miristisin setara dengan 15

g bubuk pala (Stein *et al.*, 2001). Dalam dosis 400 mg (sesuai dengan 6-7 mg/kg BB), miristisin menghasilkan "stimulasi otak ringan" pada 4 dari 10 subjek manusia (Hallstrom & Thuvander, 1997). Beberapa keracunan telah dilaporkan setelah konsumsi sekitar 5 gram pala sesuai dengan sekitar 1-2 mg myristicin/kg BB (Hallstro & Thuvander, 1997). Alasan terjadinya hal tersebut adalah karena efek gabungan antara miristisin dan senyawa lain yang terkandung pada pala (Hallstrom & Thuvander, 1997).

Pengetahuan masyarakat terkait khasiat dan keamanan obat herbal di Indonesia terbatas pada penggunaan secara empiris dari masa lampau yang diwariskan ke generasi selanjutnya (Hafid, 2019). Miristisin dapat menimbulkan toksisitas jika digunakan dalam dosis besar, namun hingga saat ini belum diketahui dosis miristisin yang dapat menimbulkan efek toksik (Mounangga *et al.*, 2015). Uji toksisitas akut dilakukan selama 24 jam untuk menemukan seberapa besar dosis toksik miristisin, hal tersebut dilakukan untuk menetapkan potensi ketoksikan akut, potensi kisaran LD_{50} atau dosis toksik obat terkait, pada satu jenis hewan uji atau lebih (Peraturan BPOM, 2022). Data yang dikumpulkan dikatakan data kualitatif jika dilihat dari gejala fisiologis, mekanisme toksik, dan gejala klinis (Jenova, 2009). Gejala toksisitas yang timbul dan kematian hewan uji ditetapkan sebagai parameter akhir, hewan yang menunjukkan rasa nyeri, sakit dan distress dapat dikorbankan lebih dini sejalan prinsip kesejahteraan hewan (Peraturan BPOM, 2022). Uji toksisitas akut oral metode *fixed dose* dilakukan untuk mengamati efek toksik yang muncul dalam waktu singkat setelah pemberian sediaan uji dan menggunakan lebih sedikit hewan uji (Merdana *et al.*, 2020).

Belum ditemukan adanya penelitian mengenai toksisitas menggunakan sampel miristisin, penelitian yang terdahulu mengasumsikan dosis toksisitas miristisin dari kandungan miristisin dalam serbuk pala dan minyak atsiri pala. Berdasarkan latar belakang berikut maka penelitian ini dilaksanakan untuk memberikan informasi mengenai toksisitas akut miristisin.

METODE

Alat dan Bahan

Alat

Timbangan digital (SF-499), spuit oral 1 mL, kandang mencit (75 cm x 50 cm x 20 cm), labu ukur (pyrex), pipet volume (pyrex).

Bahan

Miristisin yang diperoleh dari penelitian sebelumnya (Ansory *et al.*, 2020), mencit putih betina (*Mus musculus*) galur swiss berusia 2-3 bulan dengan berat badan berkisar 20-30 gram, PG 100% (USP DOW), aquadest, pakan mencit.

Jalannya Penelitian

Pembuatan Larutan Uji Miristisin

Miristisin sebanyak 100 mg dilarutkan dalam labu ukur 100 mL menggunakan propilen glikol 10%, sehingga didapatkan larutan miristisin 1000 mg/L. Kemudian membuat larutan uji miristisin dengan seri konsentrasi 5, 50, 300, dan 2000 mg/kg BB.

Pengelompokan Hewan Uji

Hewan uji dikelompokkan secara acak ke dalam 6 kelompok sehingga masing-masing kelompok terdapat 5 ekor mencit putih betina. Kelompok pertama adalah kelompok kontrol normal, kelompok kedua adalah kelompok kontrol negatif, kelompok ketiga, keempat, kelima, dan keenam adalah kelompok dosis 5, 50, 300, dan 2000 mg/kg BB. Sebelum dilakukan pengujian, mencit diadaptasikan selama 7 hari. Selama pengujian, pakan dan minum disediakan secara *ad libitum* dan setiap kelompok dikandangkan tersendiri (Peraturan BPOM, 2022).

Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan pada penelitian ini menggunakan 1 ekor mencit untuk mencari dosis awal yang sesuai untuk uji utama. Dosis awal pada uji pendahuluan dipilih dari tingkatan *fixed dose*: 5, 50, 300 dan 2000 mg/kg BB sebagai dosis yang diharapkan dapat memberikan gambaran efek toksik (Peraturan BPOM, 2022).

Uji Utama

Dosis yang digunakan dalam uji utama dipilih dengan memperhatikan tingkat dosis yang menimbulkan kematian dan atau gejala klinis pada uji pendahuluan. Pengujian tidak diteruskan pada dosis selanjutnya sampai diketahui apakah hewan masih bertahan hidup atau mati. Sedangkan uji batas 5000 mg/kg BB dapat dilakukan dengan pertimbangan bahwa dosis tersebut sangat relevan dengan kepentingan untuk melindungi manusia, hewan atau lingkungan (Peraturan BPOM, 2022).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan uji pendahuluan secara intensif yang dilakukan selama 24 jam pada waktu jam ke 0, 1, 2, 3, 4, dan 24 untuk melihat gejala toksiknya. Gejala toksik yang diamati pada hewan uji berupa perubahan perilaku pada hewan uji. Perubahan tingkah laku seperti *grooming* ditandai dengan kebiasaan mencit membersihkan diri dengan cara menjilati tubuhnya (Amal *et al.*, 2022). Jika frekuensi dari *grooming* meningkat maka hal tersebut menunjukkan bahwa terjadinya tekanan sistem saraf pusat. Perubahan tingkah laku terjadi pada hewan uji mulai dari dosis 5 mg/kg BB, sehingga dosis pertama pada uji utama adalah 5 mg/kg BB

Hewan uji yang sering digunakan dalam percobaan salah satunya adalah mencit karena memiliki kelebihan seperti mudah bereproduksi, siklus hidup relatif pendek, penanganan mudah, karakteristik reproduksi mirip dengan hewan mamalia lain, struktur anatomi, fisiologis dan genetik yang hampir sama dengan manusia (Mutiarahmi *et al.*, 2021). Hasil pengamatan uji utama toksisitas akut ditentukan menurut penggolongan klasifikasi Hodge dan Sterner, 1995 yang tercantum dalam peraturan BPOM 2022. Kriteria penggolongan tersebut digunakan untuk penentuan kategori toksisitas akut, seperti pada tabel I.

Dikarenakan tidak terdapat kematian pada dosis tertinggi 2000 mg/kg BB, maka miristisin memiliki kisaran dosis LD_{50} lebih dari 2000 mg/kg BB. Berdasarkan BPOM 2022, miristisin adalah tergolong bahan yang memiliki toksisitas ringan.

Setelah sediaan uji diberikan, maka pengamatan terhadap gejala toksisitas yang terjadi pada hewan uji akan dilakukan pada satu jam pertama, lebih dari 50 % hewan uji dari semua dosis melakukan *grooming* dan *rearing* hal tersebut dapat disebabkan oleh rasa tidak nyaman karena telah diberikan sediaan melalui pemberian oral. Pada jam ke-2 *grooming* dan *rearing* yang dilakukan oleh hewan uji mulai berkurang dan tidak menunjukkan efek toksik, beberapa mencit mulai bergerak aktif, namun pada dosis 50, 300, dan 2000 mg/kg BB durasi *grooming* dan *rearing* tetap seperti sebelumnya, pada dosis 2000 mg/kg BB terdapat 1 hewan uji yang menunjukkan nafas yang terengah-engah, dan terdapat 1 hewan uji yang lemas. Pada jam ke-3 mencit yang diberikan dosis 5 mg/kg BB mulai menunjukkan tingkah laku yang normal dan bergerak aktif, untuk mencit yang diberikan dosis 50 mg/kg BB terdapat 1 mencit yang menunjukkan nafas terengah-engah, dan mencit yang lain melakukan *grooming* namun tidak dalam waktu yang lama, untuk mencit yang diberikan dosis 300 mg/kg BB beberapa mencit masih terlihat menunjukkan perilaku *grooming*, untuk mencit yang diberikan dosis 2000 mg/kg BB 2 mencit masih didapati lemas. Pada jam ke 4 masih ada beberapa mencit yang melakukan *grooming* namun frekuensinya menurun, dan pada dosis 2000 mg/kg BB terdapat mencit yang lemas dan nafas yang terengah engah. Perilaku *grooming* bisa disebabkan karena perlakuan saat pemberian sediaan oral yang menyebabkan hewan uji merasa tidak nyaman. Perilaku nafas abnormal dan lemas yang terjadi pada hewan uji dosis 2000 mg/kg BB bisa dikarenakan karena kondisi awal hewan uji yang berbeda beda. Untuk pengamatan pada jam selanjutnya, hewan uji terlihat bergerak aktif seperti biasa dan aktif. Untuk semua dosis tidak terjadi kematian, dan tidak terjadi tanda toksisitas lainnya seperti diare, salivasi, bulu rontok, agresif, dan koma.

Berat badan hewan uji pada saat sebelum diberikan sediaan dan setelah pemberian sediaan uji dimonitor setiap hari selama 14 hari. Grafik dibawah merupakan hasil pengamatan berat badan mencit selama 14 hari. Secara umum, perubahan berat badan pada hewan uji dapat menandakan toksisitas yang terjadi setelah terpapar zat toksik. Perubahan berat badan merupakan salah satu indikator adanya efek samping dari suatu obat atau senyawa kimia dan menurun secara signifikan apabila berat badan berkurang 10% dari berat awal hewan uji. *Error bar* pada grafik menunjukkan nilai untuk mengukur jarak data terhadap rata-rata berat badan mencit (Haley & Freeman, 2018).

Tabel I. Kriteria penggolongan sediaan uji (BPOM., 2022)

Tingkat Toksisitas	LD ₅₀ oral	Klasifikasi
1	≤5 mg/Kg	Super toksik
2	5-50 mg/Kg	Sangat toksik
3	>50-500mg/Kg	Toksik
4	>500-2000mg/Kg	Toksik sedang
5	>2000-5000mg/Kg	Toksik ringan
6	>5000mg/Kg	Tidak toksik

Tabel II. Kematian mencit

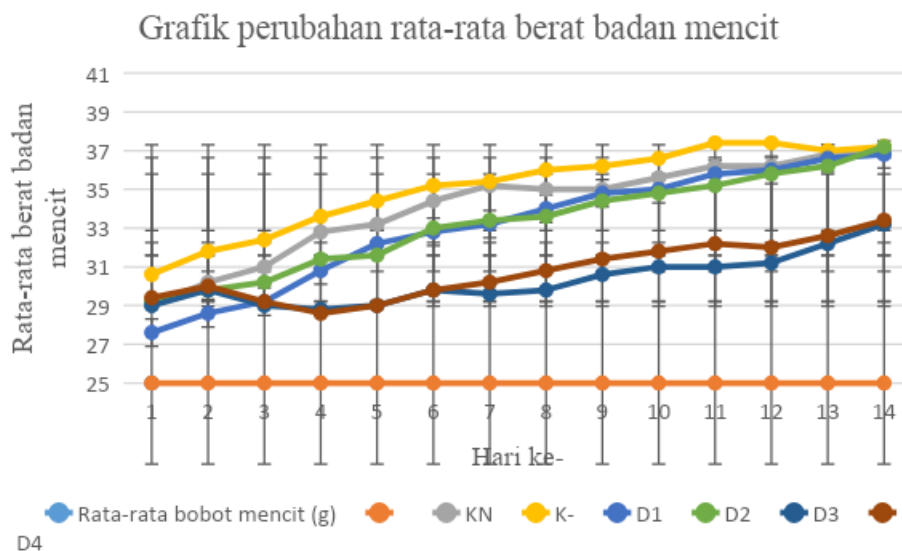
Kelompok	Dosis (mg/kg BB)	Jumlah mencit	
		Hidup	Mati
KN	-	5	0
K-	PG 10%	5	0
D1	5	5	0
D2	50	5	0
D3	300	5	0
D4	2000	5	0

Tabel III. Pengamatan tingkah laku 6 kelompok hewan uji (n = 30)

Pengamatan	Kelompok	1j	2j	3j	4j	H2-H14
<i>Grooming</i>	KN	1*	-	-	-	-
	K-	4*	-	-	-	-
	D1	3*	-	-	-	-
	D2	3*	-	-	-	-
	D3	2*	-	-	-	-
	D4	5*	-	-	-	-
Lemas	KN	-	-	-	-	-
	K-	-	-	-	-	-
	D1	-	-	-	-	-
	D2	-	-	-	-	-
	D3	1*	-	-	-	-
	D4	1*	1*	1*	1*	-
Nafas abnormal	KN	-	-	-	-	-
	K-	-	-	-	-	-
	D1	-	-	-	-	-
	D2	1*	-	-	-	-
	D3	1*	1*	-	-	-
	D4	1*	1*	1*	-	-
Piloereksi		-	-	-	-	-
Konvulsi		-	-	-	-	-
Feses		N	N	N	N	N
Salivasi	Semua kelompok	-	-	-	-	-
Lakrimasi		-	-	-	-	-
Hiperaktivitas		-	-	-	-	-
Mortalitas		-	-	-	-	-

Keterangan : N = Normal; v = Terdapat perilaku toksik; * = Jumlah mencit dengan efek toksik; = Tidak terdapat perilaku toksik; H2-H14 = Kondisi hewan uji normal dan tidak terdapat perubahan tingkah laku

Data di bawah cenderung tidak berfluktuasi karena simpangan antara data tidak terlalu jauh sehingga rata-rata berat badan mencit tidak saling berbeda signifikan.



Gambar 1. Penurunan berat badan 6 kelompok hewan uji (n = 30)

Perubahan berat badan ini normal seiring dengan bertambahnya umur hewan uji. Penurunan yang cukup signifikan dialami oleh mencit yang diberikan dosis 300 mg/kg BB dan 2000 mg/kg BB pada hari ke 2 sampai hari ke 4, penurunan bobot mencit bisa dikarenakan nafsu makan yang berkurang, pemberian pakan yang tidak seragam, dan kondisi hewan uji (*stress*) (Sireeratawon *et al.*, 2010). Pada hari selanjutnya berat badan mencit kembali naik, hal ini menunjukkan bahwa nafsu makan mencit telah kembali normal. Dari hasil analisis statistik, diketahui bahwa terdapat perbedaan yang bermakna pada perubahan berat badan mencit antar kelompok pada hari pertama dan hari ke-3 pengamatan dengan nilai sig ($p < 0,05$).

Truitt *et al.*, (1960) melakukan suatu eksperimen untuk menguji toksisitas akut miristisin menggunakan 25 tikus putih jantan dengan tingkatan dosis 200-1000 mg/kg BB, hasil menunjukkan bahwa dosis besar menimbulkan hiper ereksibilitas diikuti oleh depresi sistem saraf pusat, dan disimpulkan bahwa LD_{50} dalam penelitian tersebut adalah 1000 mg/kg BB. Dilakukan uji uji toksisitas subakut kepada 12 tikus putih yang diberikan miristisin setiap hari dengan dosis 10 mg/kg BB dalam makanan selama 26 hari, tidak ada perbedaan berat badan antara kelompok dosis dan kelompok kontrol, studi histologis hati/ginjal menunjukkan tidak ada kelainan yang dapat dikaitkan dengan miristisin. Pala telah digunakan secara eksternal untuk mengobati infeksi kulit, rematik dan kelumpuhan (Abourashed, 2010) dan untuk pengobatan psikologis gangguan (Antonio *et al.*, 2013) Pala dalam dosis yang cukup dilaporkan bersifat psikoaktif dengan halusinasi, perasaan euforia, dan delusi (Zaheer *et al.*, 2016)

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian toksisitas akut dapat diambil kesimpulan bahwa miristisin masuk kedalam kategori sedikit toksik karena hewan uji menunjukkan gejala toksisitas pada hari pertama. Namun sampai dosis 2000 mg/kg BB tidak didapati kematian

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Yayasan Pendidikan Setia Budi dan CV ANSChem yang sudah memberikan bantuan dana dan bahan pada penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abourashed EA, Khan IA (2010) Nutmeg. In: Khan IA, Abourashed EA (eds) Leung's encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetics, 3rd edn. Wiley. Hoboken, 467-470
- Amal, S., Sri Gunarti, N., & Sintia Saragih, D. (2022). Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Daun

- Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) pada Mencit Betina dengan Metode Fixed Dose. *Journal of Pharmacopolium*, 5(2), 190–198.
- Ansory, H. M., Fitriani, I. N., Handayani, S., & Aznam, N. (2021). Synthesis of a novel chalcone derivative from myristicin for skin cancer preventive activity. *Rasayan Journal of Chemistry*, 14(3), 1493–1498.
- Ansory, H. M., Putri, P. K. K., & Nilawati, A. (2018). Analisis Senyawa Minyak Atsiri Biji Pala Secara Gc- Ms Dan Uji Aktivitas Antibakteri Terhadap *Escherichia coli*. *Prosiding SNST*, 4, 19–25.
- Ansory, H. M., Sari, E. N., Nilawati, A., Handayani, S., & Aznam, N. (2020). *Sunscreen and Antioxidant Potential of Myristicin in Nutmeg Essential Oils (Myristica fragrans)*. 26, 138–142.
- Antonio, R. L., Kozasa, E. H., Galdurōz, J. C. F., Dawa, Dorjee, Y., Kalsang, T., Norbu, T., Tenzin, T., & Rodrigues, E. (2013). Formulas used by Tibetan doctors at Men-Tsee-Khang in India for the treatment of neuropsychiatric disorders and their correlation with pharmacological data. *Phytotherapy Research*, 27(4), 552–563.
- Boukandou Mounanga, M., Mewono, L., & Aboughe Angone, S. (2015). Toxicity studies of medicinal plants used in sub-Saharan Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, 174(June), 618–627. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.06.005>
- Green, R. K. (1959). Nutmeg Poisoning. *Natural Toxins*, 171, 166–168.
- Hafid, R. (2019). Pengetahuan Lokal Tentang Pemanfaatan Tanaman Obat Pada Masyarakat Tolaki Di Kabupaten Konawe Sulawesi Tenggara. *Pangadereng : Jurnal Hasil Penelitian Ilmu Sosial Dan Humaniora*, 5(1), 46–63.
- Haley, W. E., & Freeman. (2018). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(1), 139–148. <https://doi.org/10.1109/TVCG.2014.2346298>.
- Hallstrom, H., & Thuvander, A. (1997). Toxicological evaluation of myristicin. *Natural Toxins*, 5(5), 186–192. <https://doi.org/10.1002/19970505nt3>
- Merdana, I. M., Azizati, S. K. N., Arjana, A. A. G., Adi, A. A. M., & Sudira, I. W. (2020). Penilaian Potensi Toksisitas Akut Dermal Obat Hewan Alami Minyak Rajas pada Tikus Wistar. *Buletin Veteriner Udayana*, 21, 205.
- Mutiarahmi, C. N., Hartady, T., & Lesmana, R. (2021). Use of Mice As Experimental Animals in Laboratories That Refer To the Principles of Animal Welfare: a Literature Review. *Indonesia Medicus Veterinus*, 10(1), 134–145.
- Peraturan BPOM. (2022). Peraturan Badan Pengawas Obat Dan Makanan Nomor 10 Tahun 2022 Tentang Pedoman Uji Toksisitas Praklinik Secara In Vivo. *Badan Pengawas Obat Dan Makanan Republik Indonesia*, 1–220.
- Seneme, E. F., Dos Santos, D. C., Silva, E. M. R., Franco, Y. E. M., & Longato, G. B. (2021). Pharmacological and therapeutic potential of myristicin: A literature review. *Molecules*, 26(19), 1–15.
- Sireeratawon, S., Piyabha, P., Singhala, T., Wongkrajan, Y., Tamsiririrkku, R., Punsrira, J., Ruangwise, N., Saray, S., Lerdvuthisopo, N., & Jaijo, K. (2010). Toxicity evaluation of sappan wood extract in rats. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 93(SUPPL 7), 50–57.
- Stein, U., Greyer, H., & Hentschel, H. (2001). Nutmeg (myristicin) poisoning - Report on a fatal case and a series of cases recorded by a poison information centre. *Forensic Science International*, 118(1), 87–90. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(00\)00369-8](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(00)00369-8).
- Truitt, E. B. (1961). The pharmacology of myristicin. A contribution to the psychopharmacology of nutmeg. *Journal of Neuropsychiatry*, 2, 205–210.
- Zaheer, I., Rahman, S. Z., Khan, R. A., & Parveen, M. (2016). An experimental study of ethanolic extract of *Myristica fragrans* in morphine dependence. *Bangladesh Journal of Medical Science*, 15(2), 224–229.