

Toksistas Akut Minyak Atsiri Biji Pala pada Mencit Jantan

Acute Toxicity of Nutmeg Essential Oil on Male Mice

Ghani Abhi Majid¹, Yane Dila Keswara², Hery Muhamad Ansory^{2*}

¹Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Universitas Setia Budi Surakarta, Surakarta, Indonesia

²Faculty of Pharmacy, Universitas Setia Budi Surakarta, Surakarta, Indonesia

Article Info	ABSTRAK (10 PT)
<p>Article history:</p> <p>Received 10 03, 2023 Revised 11 19, 2023 Accepted 11 25, 2023</p> <p>Kata kunci</p> <p>Minyak atsiri biji pala Toksistas akut Mencit putih Dosis aman</p>	<p>Minyak atsiri biji pala, dengan berbagai aktivitasnya, mendorong perlunya pemahaman terhadap tingkat toksistasnya agar penggunaan minyak atsiri biji pala dapat dilakukan dengan aman dan efektif. Pada penelitian ini, minyak atsiri pala diisolasi dengan metode distilasi dari biji pala, kemudian kandungan kimia dalam minyak atsiri pala dianalisis dengan GC-<i>Ms</i>. Uji toksistas akut pada penelitian ini menggunakan metode fixed dose (dosis 5, 50, 300, 2000, dan 5000 mg/KgBB mencit). Parameter pengamatan hewan uji meliputi gejala toksik, berat badan, serta makropatologi organ. Hasil menunjukkan minyak pala memiliki kandungan kimia pinen (23,90%) dan Sabinen (21,49%), β-pinen (14,79%), dan Miristisin (9,69%). Minyak atsiri pala memiliki LD_{50} yang melebihi dosis 5000 mg/kgBB, menunjukkan ketidaktoksikan praktis. Namun, gejala toksistas dan kerusakan organ lambung dan hati pada dosis 5000 mg/KgBB menunjukkan adanya efek toksik minyak atsiri biji pala pada mencit. Penelitian ini memberikan pandangan lebih mendalam terkait batas dosis aman dan perlu kewaspadaan ekstra terkait penggunaan minyak atsiri biji pala pada tingkat dosis tinggi.</p>
<p>Keywords:</p> <p>Nutmeg essential oil Acute toxicity White mice Safe dosage</p>	<p>ABSTRACT (10 PT)</p> <p>The essential oil of nutmeg seeds, with its diverse activities, emphasizes the need for an understanding of its toxicity level to ensure the safe and effective use of nutmeg essential oil. In this study, nutmeg essential oil was isolated from nutmeg seeds using the distillation method, and the chemical content in the essential oil was analyzed with GC-<i>Ms</i>. Acute toxicity testing in this study utilized the fixed dose method (5, 50, 300, 2000, and 5000 mg/kgBW in mice). Parameters observed in the test animals included toxic symptoms, body weight, and organ macro-pathology. The results showed that nutmeg oil contains chemical compounds such as pinene (23.90%), sabinene (21.49%), β-pinene (14.79%), and myristicin (9.69%). Nutmeg essential oil has an LD_{50} exceeding the 5000 mg/kgBW dose, indicating practical non-toxicity. However, toxic symptoms and damage to the stomach and liver organs at the dose of 5000 mg/kgBW indicate the toxic effects of nutmeg essential oil in mice. This research provides a deeper insight into the safe dosage limits and emphasizes the need for extra caution regarding the use of nutmeg essential oil at high dosage levels.</p>

Corresponding Author:

Hery Muhamad Ansory

Faculty of Pharmacy, Universitas Setia Budi Surakarta

Jl. Letjen Sutoyo, Mojosongo, Kec. Jebres, Kota Surakarta, Jawa Tengah 57127

email: hery.ansory89@setiabudi.ac.id ; hery.ansory89@gmail.com

This is an open-access article under the [CC BY-SA](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/) license.



1. PENDAHULUAN

Minyak atsiri pala, yang telah diakui memiliki sejumlah aktivitas seperti antidepresan, antibakteri, pengobatan rematik, sakit perut, masuk angin, dan insomnia [1]–[3], merupakan bahan yang telah dikenal sejak lama untuk berbagai manfaat kesehatannya [4], [5]. Meskipun begitu, beberapa penelitian menyoroti potensi toksisitasnya, terutama dalam dosis yang tinggi [6]. Dilaporkan bahwa satu sampai tiga buah pala atau 5-30 gram pala dapat menginduksi efek psikogenik, dan dosis minimal 5 gram pala bubuk dianggap sebagai dosis toksik. Bahkan, stimulasi otak yang ringan dapat terjadi dengan konsumsi 400 mg miristisin, setara dengan 15 gram bubuk pala [1], [7]. Meskipun dalam dosis tertentu miristisin dapat memberikan "stimulasi otak ringan", namun adanya dosis toksik dan bahkan kasus keracunan menunjukkan pentingnya memahami dan menilai tingkat toksisitas dari minyak atsiri biji pala. Oleh karena itu, penelitian ini diarahkan untuk mengetahui profil toksisitas akut minyak atsiri biji pala pada mencit, dengan tujuan untuk memberikan wawasan lebih mendalam terkait batas dosis aman dalam penggunaan minyak atsiri biji pala pada tingkat dosis tinggi.

Pala (*Myristica fragrans*), buah asli Indonesia, memiliki tiga bagian utama: daging buah pala, fuli pala (selaput biji), dan biji pala. Minyak atsiri dapat diisolasi dari ketiga bagian tersebut dan menghasilkan minyak dengan kadar senyawa kimia yang bervariasi [3], [8]–[10]. Minyak atsiri pala terdiri dari hidrokarbon terpen, seperti α -pinen, Sabinen, β -pinen, Limonen, dan Terpeneol-4, sebagai senyawa dengan presentase yang cukup tinggi. Senyawa lain berupa turunan fenilpropanoid, seperti Miristisin, Safrol, elemisin, eugenol, juga terkandung dalam jumlah tertentu [4], [11]–[14].

Saat menggunakan produk herbal, pemahaman terhadap tingkat keamanannya menjadi hal penting guna mencegah kemungkinan efek berbahaya yang tidak diinginkan. Namun, saat ini, data yang mendukung klaim keamanan terkait kandungan minyak atsiri biji pala masih terbatas. Hanya nilai LC_{50} yang telah diukur dari hasil uji toksisitas minyak atsiri pala menggunakan metode BSLT, yaitu sebesar 177,072 ppm [15]. Oleh karena itu, untuk menjamin keamanan penggunaannya, diperlukan pengujian tambahan pada hewan laboratorium guna menilai potensi efek toksik yang mungkin timbul. Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan pemahaman mengenai LD_{50} , menentukan dosis yang aman dalam formulasi minyak pala, dan mengidentifikasi gejala toksik yang mungkin muncul.

2. METODE

ALAT DAN BAHAN

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah satu set destilasi uap, GC-MS-QP2010S SHIMADZU, kandang mencit ukuran P 37 cm x L 28 cm x T 13 cm. Bahan sampel yang digunakan adalah biji pala (*Myristica fragrans* H.) dari Bogor, Jawa Barat, mencit putih jantan dengan usia 30-120 hari dan berat badan 20-30 gram, CMC 0,5% sebagai kontrol negatif dan pelarut aquadest

CARA KERJA

Isolasi Minyak Atsiri Pala

Isolasi minyak atsiri dilakukan dengan cara destilasi uap dari 5 Kg serbuk biji pala, hasil dianalisis meliputi uji organoleptis, identifikasi minyak atsiri, penetapan indeks bias, uji kelarutan etanol, dan uji GC-MS dengan kondisi analisis: suhu pada oven 80°C, suhu pada injector 200°C, suhu pada detector 230°C. Gas pembawa helium dengan kecepatan aliran 1 ml/menit. Waktu retensi 40 menit, dan mass range 40-400m/z.



Uji Toksisitas Akut

Penelitian ini melibatkan penetapan dosis minyak atsiri biji pala dengan menggunakan metode fixed dose, yaitu pada dosis 5, 50, 300, 2000, dan 5000 mg/KgBB. Sebelum administrasi sediaan uji, mencit menjalani puasa selama 3-4 jam dengan tetap diberi akses minum. Setelah itu, mencit ditimbang untuk menentukan volume pemberian yang sesuai. Pemberian sediaan uji dilakukan secara oral melalui sonde oral dalam dosis tunggal, dengan pengamatan individual selama 30 menit pertama, setiap 4 jam dalam 24 jam awal, dan sekali sehari selama 14 hari berikutnya. Durasi pengamatan dapat disesuaikan berdasarkan respons toksik dan waktu onset serta durasi penyembuhan. Pencatatan sistematis dilakukan terhadap waktu timbul atau hilangnya gejala toksisitas, termasuk gejala yang mungkin tertunda. Pengamatan tambahan diterapkan jika mencit menunjukkan gejala toksik secara berkelanjutan. Pada akhir penelitian, mencit yang masih hidup ditimbang dan kemudian dikorbankan. Pengamatan makropatologi dilakukan pada organ-organ utama, termasuk lambung, paru-paru, jantung, hati, dan ginjal. Perbandingan indeks organ, dihitung sebagai persentase dari bobot badan, dilakukan untuk setiap kelompok. Indeks organ kelompok yang menerima sediaan uji dibandingkan dengan kelompok plasebo. Organ-organ seperti lambung, paru-paru, jantung, hati, dan ginjal diamati secara makropatologi dan dibandingkan dengan kelompok placebo.

3. HASIL

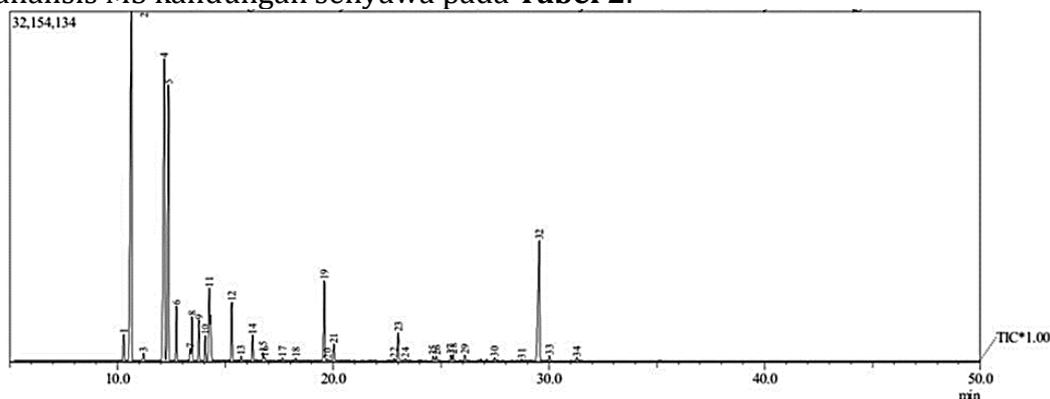
Isolasi Minyak Atsiri Biji Pala

Hasil isolasi dari 5 kg biji pala didapatkan minyak atsiri biji pala sebanyak 61 mL dengan rendemen minyak atsiri 1,22 %. Minyak dianalisis organoleptis dan sifat fisika. Hasil seperti yang disajikan dalam **Tabel 1**.

Tabel 1. Hasil analisis organoleptis dan sifat fisika minyak atsiri biji pala

Organoleptis	Hasil analisis sampel	SNI 06-2388 2006
Bentuk	Cair	Cair
Rasa	Pedas	-
Warna	Bening kekuningan	Tidak berwarna-kuning pucat
Bau	Khas minyak pala	Khas minyak pala
Indeks bias	1,4781	1,470 – 1,497
Bobot jenis	0,8964	0,880 – 0,910
kelarutan dalam etanol	1:3	1:3

Minyak hasil isolasi dianalisis kandungan kimia dengan Kromatografi gas spektrometri massa, dan didapatkan hasil kromatogram GC seperti pada **Gambar 1** dan hasil analisis MS kandungan senyawa pada **Tabel 2**.



Gambar 1. Hasil kromatogram GC minyak atsiri pala hasil isolasi



Tabel 2. Kandungan senyawa pada minyak atsiri biji pala berdasarkan hasil GC-MS.

No.	R. Time (menit)	Kandungan Senyawa	% Area senyawa
1	10,283	α -pinen	1,31
2	10,640	α -pinen	23,90
3	11,205	Champen	0,40
4	12,170	Sabinen	21,49
5	12,356	β -pinen	14,79
6	12,728	β -Mirsen	2,38
7	13,370	α -Phellandren	0,59
8	13,454	α -3-Caren	2,03
9	13,770	α -4-Caren	1,88
10	14,061	1-metil-4-(1-metiletil)-benzena	1,21
11	14,250	Limonen	5,75
12	15,296	γ -Terpinen	2,80
13	15,729	Trans-Sabinenhidrat	0,23
14	16,261	Terpinolen	1,21
15	16,747	Linalool	0,38
16	16,824	Cis-Sabinenhidrat	0,14
17	17,645	Trans-Pinenhidrat	0,16
18	18,256	Isobornilasetat	0,15
19	19,584	Terpineol-4	4,36
20	19,736	Phenilaseton	0,09
21	20,027	α -Terpineol	0,91
22	22,818	Bornil asetat	0,12
23	23,008	Safrol	1,53
24	23,341	<i>p</i> -Pentilanisol	0,11
25	24,630	Mircenilasetat	0,32
26	24,781	Eugenol	0,28
27	25,453	Geranilasetat	0,31
28	25,561	α -Cubeben	0,33
29	26,099	Metil Eugenol	0,34
30	27,481	Eugenol	0,22
31	28,729	Anisilaseton	0,09
32	29,547	Miristisin	9,69
33	30,021	Elemicin	0,29
34	31,295	3,5-Dodecadin, 2-metil-	0,21

Hasil Uji Toksisitas Akut

Tabel 3 memuat data persentase kematian hewan uji pada berbagai dosis minyak atsiri biji pala. Analisis kematian hewan uji memberikan gambaran yang jelas tentang respons toksik dan tingkat keamanan pada masing-masing dosis yang diujikan.

Tabel 3. Persentase kematian hewan uji

No	Kelompok	Dosis (mg/KgBB)	Jumlah hewan mati	% kematian
1	Kelompok plasebo	CMC 0,5%	0	0
2	Dosis I	5	0	0
3	Dosis II	50	0	0
4	Dosis III	300	0	0
5	Dosis IV	2000	0	0
6	Dosis V	5000	1	20

Informasi mengenai hasil pengamatan gejala toksik berupa "*grooming*" pada hewan uji tersaji pada **Tabel 4**, data ini memberikan pemahaman yang tingkat keparahan dan frekuensi perilaku "*grooming*" pada berbagai dosis minyak atsiri biji pala.



Tabel 4. Hasil pengamatan gejala toksik grooming pada hewan uji

Kelompok Dosis	Jumlah mencit yang mengalami grooming						
	Jam ke-0	Jam ke-0,5	Jam ke-1	Jam ke-2	Jam ke-4	Jam ke-6	Jam ke-24
Kelompok plasebo (CMC 0,5%)	0	0	0	0	0	0	0
Dosis I (5 mg/KgBB)	0	0	2	1	0	0	0
Dosis II (50 mg/KgBB)	0	1	2	2	1	1	0
Dosis III (300 mg/KgBB)	0	0	1	2	2	0	1
Dosis IV (2000 mg/KgBB)	0	1	4	3	0	1	1
Dosis V (5000 mg/KgBB)	0	2	4	3	1	0	1

Tabel 5 menyajikan hasil pengamatan gejala toksik berupa perubahan piloereksi pada hewan uji selama periode penelitian.

Tabel 5. Hasil pengamatan gejala toksik perubahan piloereksi pada hewan uji

Kelompok Dosis	Jumlah mencit yang mengalami piloereksi						
	Jam ke-0	Jam ke-0,5	Jam ke-1	Jam ke-2	Jam ke-4	Jam ke-6	Jam ke-24
Kelompok plasebo (CMC 0,5%)	0	0	0	0	0	0	0
Dosis I (5 mg/KgBB)	0	0	0	0	0	0	0
Dosis II (50 mg/KgBB)	0	0	0	0	0	0	0
Dosis III (300 mg/KgBB)	0	0	0	0	0	0	0
Dosis IV (2000 mg/KgBB)	0	0	0	0	0	0	0
Dosis V (5000 mg/KgBB)	0	2	2	1	0	0	0

Tabel 6 menyajikan hasil pengamatan gejala toksik berupa perubahan tremor pada hewan uji selama periode penelitian.

Tabel 6. Hasil pengamatan gejala toksik tremor pada hewan uji

Kelompok Dosis	Jumlah mencit yang mengalami tremor						
	Jam ke-0	Jam ke-0,5	Jam ke-1	Jam ke-2	Jam ke-4	Jam ke-6	Jam ke-24
Kelompok plasebo (CMC 0,5%)	0	0	0	0	0	0	0
Dosis I (5 mg/KgBB)	0	0	0	0	0	0	0
Dosis II (50 mg/KgBB)	0	0	0	0	0	0	0
Dosis III (300 mg/KgBB)	0	0	0	1	1	0	0
Dosis IV (2000 mg/KgBB)	0	0	0	0	2	0	0
Dosis V (5000 mg/KgBB)	0	0	2	1	1	0	1

Tabel 7 menyajikan hasil pengamatan gejala toksik berupa bernafas pendek dan tersendat pada hewan uji selama periode penelitian.

Tabel 7. Hasil pengamatan gejala toksik bernafas pendek dan tersendat pada hewan uji

Kelompok Dosis	Jumlah mencit yang bernafas pendek dan tersendat						
	Jam ke-0	Jam ke-0,5	Jam ke-1	Jam ke-2	Jam ke-4	Jam ke-6	Jam ke-24
Kelompok plasebo (CMC 0,5%)	0	0	0	0	0	0	0
Dosis I (5 mg/KgBB)	0	0	0	0	0	0	0
Dosis II (50 mg/KgBB)	0	0	0	0	0	0	0
Dosis III (300 mg/KgBB)	0	0	0	0	0	0	0
Dosis IV (2000 mg/KgBB)	0	0	1	0	0	0	0
Dosis V (5000 mg/KgBB)	0	1	2	2	0	0	0

Tabel 8 menyajikan hasil pengamatan gejala toksik berupa ptosis, penurunan kelopak mata atas, sehingga tampaknya mata bagian atas atau kelopak mata terlihat lebih rendah dari biasanya, pada hewan uji selama periode penelitian.



Tabel 8. Hasil pengamatan gejala toksik ptosis pada hewan uji.

Kelompok Dosis	Jumlah mencit yang gejala ptosis						
	Jam ke-0	Jam ke-0,5	Jam ke-1	Jam ke-2	Jam ke-4	Jam ke-6	Jam ke-24
Kelompok plasebo (CMC 0,5%)	0	0	0	0	0	0	0
Dosis I (5 mg/KgBB)	0	0	0	0	0	0	0
Dosis II (50 mg/KgBB)	0	0	0	0	0	0	0
Dosis III (300 mg/KgBB)	0	0	1	0	0	0	0
Dosis IV (2000 mg/KgBB)	0	1	2	1	0	0	0
Dosis V (5000 mg/KgBB)	0	0	3	3	1	0	0

Tabel 9 menyajikan hasil pengamatan gejala toksik berupa diare pada hewan uji selama periode penelitian.

Tabel 9. Hasil pengamatan gejala toksik diare pada hewan uji.

Kelompok Dosis	Jumlah mencit yang gejala diare						
	Jam ke-0	Jam ke-0,5	Jam ke-1	Jam ke-2	Jam ke-4	Jam ke-6	Jam ke-24
Kelompok plasebo (CMC 0,5%)	0	0	0	0	0	0	0
Dosis I (5 mg/KgBB)	0	0	0	0	0	0	0
Dosis II (50 mg/KgBB)	0	0	0	0	0	0	0
Dosis III (300 mg/KgBB)	0	0	0	0	0	0	0
Dosis IV (2000 mg/KgBB)	0	0	0	0	0	0	0
Dosis V (5000 mg/KgBB)	0	1	2	1	0	0	0

Hasil pengukuran berat badan mencit pada hari ke 1, 7, dan 14 sebagai parameter penting dalam evaluasi dampak pemberian sediaan uji disajikan dalam **Tabel 9**. Data tersebut memberikan gambaran perkembangan berat badan mencit selama periode pengamatan yang dapat menjadi indikator respons terhadap perlakuan yang diberikan.

Tabel 9. Hasil pengukuran berat badan mencit hari ke 1, 7 dan 14.

Kelompok Dosis	Berat badan mencit (g) hari ke-		
	1	7	14
Kelompok plasebo (CMC 0,5%)	21.40±1.341	28.80±1.303	33.40±1.140
Dosis 5 mg/KgBB	24.80±2.167	32.20±1.788	35.40±1.341
Dosis 50 mg/KgBB	21.60±1.140	30.60±2.302	35.60±2.408
Dosis 300 mg/KgBB	21.60±1.140	27.60±2.509	32.40±1.516
Dosis 2000 mg/KgBB	22.60±1.949	26.60±3.286	30.00±2.549
Dosis 5000 mg/KgBB	23.60±1.140	26.25±3.095	31.00±3.162

Dalam **Tabel 10** disajikan hasil pengukuran bobot organ mencit sebagai bagian integral dari analisis efek sediaan uji terhadap organ tubuh. Data ini memberikan gambaran tentang potensi dampak perlakuan terhadap organ-organ utama mencit, termasuk lambung, paru-paru, jantung, hati, dan ginjal.

Tabel 10. Hasil pengukuran bobot organ mencit

Kelompok dosis	Rata-rata bobot organ (mgram) ± SD (n=5)				
	Lambung	Paru-paru	Jantung	Hati	Ginjal
Kelompok plasebo (CMC 0,5%)	20.0±1.0	6.0±0.0	4.0±0.0	55.0±10.0	13.0±0.0
Dosis I (5mg/KgBB)	23.0±1.0	5.0±0.0	4.0±0.0	47.0±10.0	13.0±0.0
Dosis II (50mg/KgBB)	31.0±1.0	6.0±0.0	4.0±0.0	61.0±10.0	13.0±0.0
Dosis III (300mg/KgBB)	24.0±0.0	6.0±0.0	4.0±0.0	53.0±10.0	12.0±0.0
Dosis IV (2000mg/KgBB)	20.0±0.0	6.0±0.0	4.0±0.0	39.0±0.0	9.0±0.0
Dosis V (5000mg/KgBB)	42.0±2.0	5.0±0.0	4.0±0.0	43.0±10.0	11.0±0.0

Dalam **Tabel 11**, terdapat data hasil pengukuran indeks organ pada mencit yang telah diberikan sediaan uji. Indeks organ mencit ini dihitung dengan membandingkan



bobot organ (lambung, paru-paru, jantung, hati, dan ginjal) dengan bobot badan mencit. Pengukuran indeks organ ini memberikan informasi tentang potensi dampak sediaan uji terhadap organ-organ vital mencit,

Tabel 11. Hasil pengukuran indeks organ mencit.

Kelompok	Indeks organ (%)				
	Lambung	Paru-paru	Jantung	Hati	Ginjal
Kelompok plasebo (CMC)	2.01±0.61	0.57±0.07	0.43±0.05	5.61±0.54	1.29±0.18
Dosis 5 mg/KgBB	2.28±0.61	0.52±0.04	0.43±0.06	4.71±1.17	1.31±0.11
Dosis 50 mg/KgBB	3.07±0.55	0.59±0.04	0.42±0.06	6.06±0.65	1.30±0.14
Dosis 300 mg/KgBB	2.44±0.47	0.59±0.04	0.45±0.06	5.29±1.08	1.21±0.17
Dosis 2000 mg/KgBB	2.04±0.46	0.56±0.14	0.42±0.03	3.88±0.44	0.94±0.15
Dosis 5000 mg/KgBB	4.22±1.77	0.51±0.06	0.40±0.06	4.28±1.04	1.07±0.17

4. PEMBAHASAN

Isolasi Minyak Atsiri Biji Pala

Hasil isolasi 5 kg biji pala menghasilkan minyak atsiri sebanyak 61 mL, dengan tingkat rendemen mencapai 1,22%. Hasil ini memperlihatkan perbedaan yang menarik jika dibandingkan dengan penelitian sebelumnya, isolasi minyak atsiri pala pada penelitian sebelumnya memiliki rendemen minyak atsiri sebesar 2% [6] dan 3,56% [14]. Perbedaan tersebut dapat disebabkan oleh berbagai faktor seperti jenis tanaman pala yang digunakan dan metode pengeringan bahan baku [9], [10]. Selain faktor tadi, kualitas dan kuantitas isolasi minyak atsiri pala dapat dipengaruhi oleh variabel seperti lokasi penanaman tanaman, umur panen buah pala, dan teknik penyulingan [16]. Selain pengaruh diatas, pada penelitian lain mengatakan bahwa cara pengeringan dapat mempengaruhi hasil rendemen dan mutu minyak atsiri [8]. Perbandingan ini menambah kompleksitas dalam pemahaman tentang variabilitas hasil isolasi minyak atsiri biji pala, dan menunjukkan bahwa faktor-faktor seperti jumlah bahan baku dan metode isolasi juga berpotensi memengaruhi rendemen minyak atsiri. Dengan demikian, hasil penelitian ini memberikan kontribusi penting dalam melengkapi pemahaman kita terhadap faktor-faktor yang dapat mempengaruhi produksi dan kualitas minyak atsiri pala.

Dalam memeriksa kesesuaian minyak atsiri biji pala dengan Standar Nasional Indonesia (SNI) 06-2388 tahun 2006, dilakukan analisis berdasarkan beberapa parameter organoleptis dan fisik yang telah ditetapkan. Hasil analisis tersebut dicocokkan dengan nilai standar yang tercantum, **Tabel 1**. Dari segi organoleptis, minyak atsiri biji pala memenuhi SNI 06-2388 tahun 2006. Bentuk cair, rasa pedas yang sesuai dengan karakteristik minyak pala, warna bening kekuningan yang tidak melampaui batas berwarna-kuning pucat, dan bau khas minyak pala menunjukkan kesesuaian dengan standar. Selanjutnya, hasil analisis fisik juga menunjukkan kesesuaian dengan standar yang telah ditetapkan dengan nilai indeks bias, bobot jenis, dan kelarutan dalam etanol yang berada dalam rentang nilai standar, dapat disimpulkan bahwa minyak atsiri biji pala juga memenuhi persyaratan fisik sesuai dengan SNI. Oleh karena itu, dari hasil analisis organoleptis dan fisik, dapat diambil kesimpulan bahwa minyak atsiri biji pala yang digunakan dalam penelitian ini sepenuhnya sesuai dengan standar SNI 06-2388 tahun 2006. Kesesuaian ini menandakan kualitas dan kemurnian minyak atsiri yang dapat diandalkan untuk keperluan penelitian.

Hasil pengamatan identifikasi minyak atsiri menunjukkan bahwa uji tetes pada permukaan air memberikan hasil yang sesuai dengan karakteristik minyak atsiri, yaitu menyebar dan tidak membuat air menjadi keruh [18]. Pemeriksaan uji tetes minyak atsiri



pada kertas saring memiliki tujuan untuk mengidentifikasi apakah ada noda lemak yang tertinggal saat minyak atsiri menguap sempurna. Hasil dari uji tetes minyak atsiri di atas kertas saring menunjukkan bahwa minyak menguap tanpa meninggalkan bercak yang tertinggal. Oleh karena itu, kesimpulan yang dapat diambil dari uji identifikasi minyak atsiri biji pala adalah bahwa sampel yang digunakan dalam penelitian ini merupakan minyak atsiri biji pala yang murni dan tidak mengandung zat-zat lain yang dapat meninggalkan noda atau kotoran pada permukaan uji.

Berdasarkan hasil analisis kandungan kimia dalam minyak atsiri pala hasil isolasi menggunakan metode GC-MS, sejumlah senyawa telah diidentifikasi. Dominasi α -pinen (23,90%) dan Sabinen (21,49%) mencerminkan kontribusi signifikan dari komponen-komponen ini dalam profil kimia minyak atsiri pala. Selain itu, ditemukan pula β -pinen (14,79%), Limonen (5,75%), dan Terpeneol-4 (4,36%) sebagai senyawa dengan presentase yang cukup tinggi. Senyawa lainnya adalah Miristisin (9,69%), α -Terpineol (0,91%), dan Safrol (1,53%).

Penting untuk menyoroti kandungan miristisin dalam minyak atsiri pala, yang merupakan senyawa khas dan memberikan kontribusi penting pada karakteristik minyak tersebut. Pada penelitian sebelumnya minyak atsiri biji pala yang didapatkan dengan metode distilasi menunjukkan kandungan miristisin sebesar 30,82% [14], menegaskan bahwa bahan yang digunakan sangat menentukan komposisi dari minyak atsiri pala yang didapatkan, juga menunjukkan peran dominan senyawa ini dalam profil kimia minyak pala yang diisolasi. Perbandingan dengan penelitian lainnya menambah dimensi pemahaman, di mana hasil isolasi dari berbagai bagian pala, seperti daging buah, fuli, dan biji, menghasilkan kadar miristisin yang bervariasi. Distilasi uap dari daging buah pala menghasilkan 0,75% dengan kadar miristisin 10,54%, fuli pala memiliki kadar miristisin tertinggi yaitu 38,45% dengan 4,77%, sementara biji pala mengandung 6,62% miristisin dengan kadar 9,24% [8]. Perbandingan ini menunjukkan variasi yang signifikan dalam kandungan miristisin antara berbagai bagian pala, dan hal ini dapat berpengaruh pada toksisitas dari minyak atsiri pala itu sendiri.

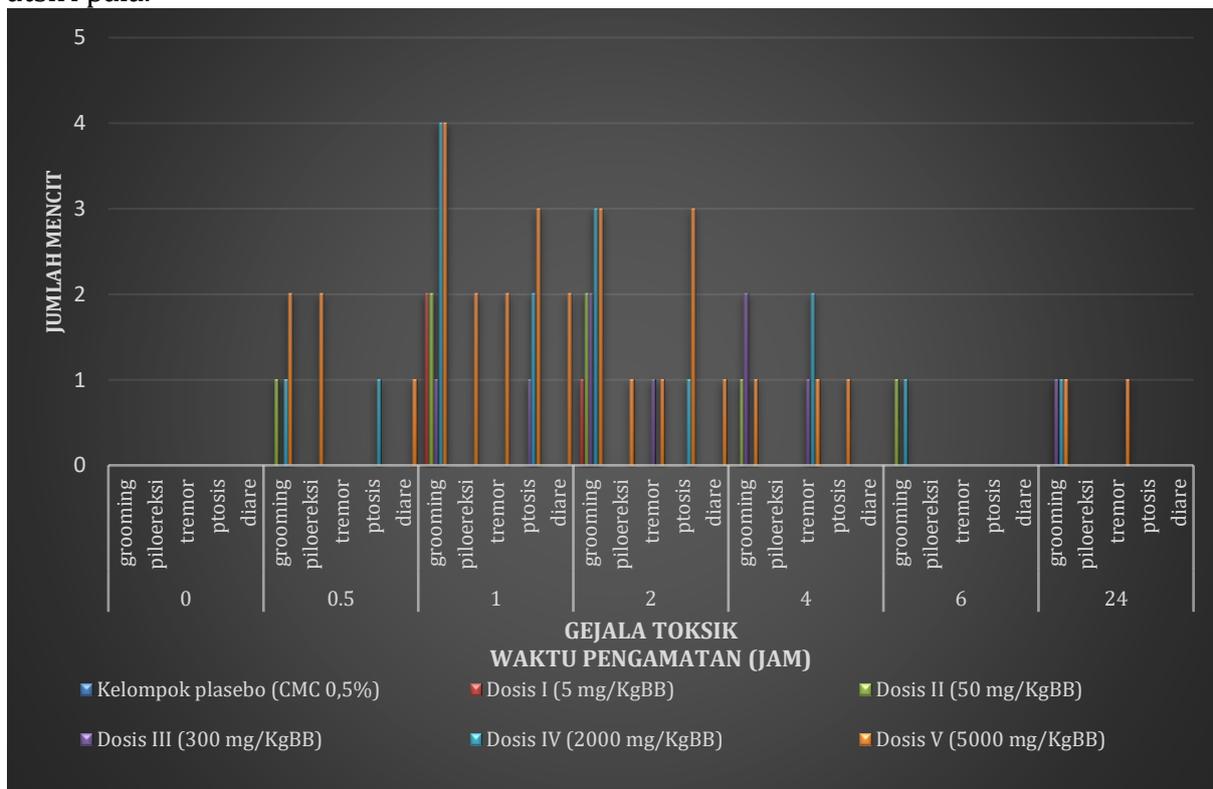
Hasil Uji Toksisitas Akut

Tabel 3 menunjukkan hasil persentase kematian hewan uji pada pengujian toksisitas akut dengan dosis tetap (*fixed doses*). Kelima kelompok, termasuk kelompok plasebo dengan CMC 0,5%, menunjukkan bahwa tidak ada kematian yang terjadi pada dosis yang diberikan. Meskipun pada dosis V dengan konsentrasi 5000 mg/KgBB, terdapat satu ekor hewan yang mengalami kematian (20%). Hal tersebut dapat disebabkan konsentrasi kandungan kimia dari minyak atsiri biji pala tidak mencapai kadar yang menyebabkan toksisitas akut. Kematian hewan uji diduga disebabkan oleh faktor fisiologis, terutama gagal pernafasan yang terkonfirmasi dengan mengecilnya organ paru-paru dilihat secara makropatologi. Menurut penelitian lain yang mengkaji mengenai toksisitas, selain karena pemberian senyawa yang bersifat toksik, kematian hewan uji dapat disebabkan oleh faktor fisiologis dan stres yang dapat menurunkan sistem imun tubuh [19]. Oleh karena itu, untuk penentuan toksisitas akut, penggunaan nilai LD_{50} tidak dapat dihitung, sehingga LD_{50} dinyatakan sebagai LD_{50} semu, yaitu nilai dosis tertinggi yang diberikan pada hewan uji tidak dapat menimbulkan kematian di atas 50% hewan uji. Jadi, nilai LD_{50} sediaan tunggal minyak atsiri biji pala untuk hewan uji mencit adalah lebih dari 5000 mg/kg BB dan termasuk kategori praktis tidak toksik, mengacu pada tabel kategori toksisitas [18]. Selain dapat terlihat dari kematian, tingkat



toksistas juga dapat dinilai melalui adanya gejala-gejala seperti *grooming*, piloereksi, tremor, bernafas pendek dan tersendat, ptosis, diare, perubahan berat badan menciit, bobot organ menciit, dan indeks organ.

Perubahan perilaku, dievaluasi melalui tindakan *grooming*, menggambarkan kecenderungan menciit untuk menjilati sebagian tubuhnya, terutama wajah, yang mungkin dipicu oleh depresi dalam sistem saraf pusat [20]. Data observasi *grooming* menciit selama periode pengamatan, tercetak dalam **Tabel 4**, menunjukkan respons yang bervariasi tergantung pada dosis dan waktu. Kelompok plasebo tidak menunjukkan kebiasaan *grooming*, sedangkan dosis I menunjukkan peningkatan pada jam ke-1 dan ke-2. Dosis II hingga dosis V menunjukkan kecenderungan peningkatan *grooming* pada jam ke-1 hingga ke-4, diikuti oleh penurunan pada jam ke-6 dan ke-24. Dosis IV mencapai lonjakan signifikan pada jam ke-2 dan ke-4, dengan penurunan selanjutnya. Peningkatan frekuensi *grooming* menciit dapat dianggap sebagai indikator peningkatan sensitivitas terhadap rasa nyeri [21]. Selain itu, tindakan *grooming* dapat disebabkan oleh adaptasi menciit terhadap bahan uji yang masuk ke dalam tubuh [21], [22]. Dari data **Tabel 4** terlihat bahwa dosis minyak atsiri biji pala memengaruhi jumlah menciit yang melakukan *grooming*. Secara umum, dosis yang lebih tinggi cenderung meningkatkan frekuensi *grooming*, menunjukkan respons yang proporsional terhadap dosis. Ini menandakan sensitivitas menciit terhadap minyak atsiri biji pala dan dapat digunakan sebagai pedoman dalam mengevaluasi dampak dosis terhadap perilaku menciit dalam konteks toksistas. Selanjutnya, analisis lebih lanjut diperlukan untuk memahami pola waktu *grooming* dengan lebih mendalam dan implikasinya terhadap respons menciit terhadap minyak atsiri pala.



Gambar 1. Jumlah menciit yang mengalami gejala toksik.



Pengamatan mencakup evaluasi piloereksi setelah pemberian sediaan uji pada hewan uji. Piloereksi merujuk pada tegaknya bulu pada bagian tubuh mencit, yang disebabkan oleh reaksi sensitivitas terhadap sentuhan. Piloereksi dikendalikan oleh saraf simpatis, khususnya oleh *arrector pili muscle* (APM), yang berperan sebagai regulator suhu [23]. **Tabel 5** menunjukkan bahwa piloereksi tidak terjadi pada dosis I hingga dosis IV. Namun, pada dosis V, pada jam ke-0,5, jam ke-1, dan jam ke-2 dengan dosis 5000 mg/KgBB, terjadi piloereksi, menunjukkan kurangnya aktivitas simpatomimetik dari sediaan yang diberikan. Sistem saraf otonom merupakan bagian dari sistem saraf motorik yang aktivitasnya tidak dikontrol secara langsung oleh kesadaran. Salah satu jenis neurotransmitter yang berperan dalam sistem saraf otonom adalah asetilkolin, yang disintesis dan dilepaskan oleh saraf kolinergik [24]. Dosis dan efek berlebih pada antikolinergik dapat mengakibatkan keracunan antikolinergik atau sindrom antikolinergik, termasuk midriasis pada mata dan kekeringan membran mukosa pada kulit [25]. Namun, pada uji toksisitas akut yang dilakukan, tidak terjadi pada hampir semua kelompok dosis.

Gejala toksik berupa tremor diamati pada mencit saat dalam keadaan diam atau bergerak, ditandai dengan getaran pada salah satu bagian tubuh. Tremor dapat disebabkan oleh efek toksik sediaan uji yang mengganggu sistem saraf pusat dalam mengendalikan kontraksi otot, menyebabkan getaran pada otot [23], [26], [27]. Analisis data pada **Tabel 6** menunjukkan bahwa tremor tidak terjadi pada semua kelompok dosis, dengan gejala pertama kali muncul pada jam ke-1 pada kelompok dosis V. Pada jam ke-2, kelompok dosis III dan V menunjukkan tremor, sedangkan kelompok dosis IV pada jam ke-4. Kelompok dosis V menunjukkan tremor pada jam ke-24. Meskipun gejala tremor teramati pada hampir semua kelompok dosis, namun tidak ada peningkatan atau penurunan yang signifikan. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa minyak atsiri biji pala tidak menunjukkan gejala tremor yang berarti pada tingkat dosis yang diuji.

Pengamatan gejala toksik mencakup kondisi breathless, yang ditandai oleh bernafas pendek dan tersendat. Gangguan pernafasan menciptakan hambatan dalam fungsi paru-paru, memengaruhi kemampuan bernafas hewan uji [28], [29]. Data pada **Tabel 7** menunjukkan bahwa perubahan pernafasan, seperti bernafas pendek dan tersendat, tidak terjadi dalam pengamatan 24 jam setelah pemberian sediaan uji. Hasil pengamatan perubahan pernafasan tidak diamati pada seluruh kelompok mencit, kecuali pada dosis 2000 mg/KgBB dan 5000 mg/KgBB, di mana kondisi breathless dapat terjadi, mungkin disebabkan oleh faktor fisiologis pada hewan uji.

Data pada **Tabel 8** mengindikasikan adanya gejala ptosis pada kelompok dosis tertentu. Ptosis, yang ditandai dengan kelopak mata mencit yang terlihat menutup seperti sedang mengantuk, terjadi pada kelompok IV 30 menit setelah pemberian sediaan uji. Sementara itu, kelompok III dan V menunjukkan gejala ptosis setelah 1 jam pemberian sediaan uji. Pada jam ke-2, hanya kelompok IV dan V yang masih menunjukkan gejala ptosis. Pada jam ke-4, hanya kelompok V yang mengalami ptosis, dan hal ini mungkin terkait dengan efek sedatif yang berkaitan dengan analgetik. Mekanisme ptosis melibatkan penekanan transmisi simpatis retikular di otak dan perubahan permeabilitas membran sel, yang mengurangi rangsangan dan menyebabkan rasa kantuk [30].

Tabel 9 mencatat bahwa mencit dengan dosis tertinggi, yaitu 5000 mg/KgBB, mengalami perubahan gastrointestinal, di mana 2 ekor mencit menunjukkan gejala diare. Hal ini menandakan bahwa minyak atsiri biji pala pada dosis tersebut dapat menimbulkan



efek diare. Minyak pala dikenal memiliki aktivitas antibakteri dengan zona hambat kategori lemah terhadap bakteri *Escherichia coli* [31]–[33]. Meskipun sebagian besar bakteri *Escherichia coli* berada dalam saluran pencernaan hewan dan manusia, mereka memiliki sifat patogen yang dapat menyebabkan diare [34].

Berdasarkan analisis data berat badan mencit dari **Tabel 10**. Pengujian Shapiro-Wilk menunjukkan bahwa data berdistribusi normal ($p > 0,05$). Selanjutnya, uji ANOVA dilakukan untuk mengevaluasi perbedaan berat badan mencit antara kelompok plasebo dan kelompok perlakuan yang menerima sediaan uji. Hasilnya menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan signifikan dalam rata-rata berat badan mencit antara kelompok plasebo dan kelompok perlakuan dengan dosis 5 mg/kgBB dan 50 mg/kgBB. Pada hari ke-7 dan ke-14, kelompok dosis 300 mg/kgBB, 2000 mg/kgBB, dan 5000 mg/kgBB mengalami penurunan berat badan, tetapi tidak signifikan. Penurunan berat badan mencit dapat disebabkan oleh faktor seperti nafsu makan yang berkurang, pemberian pakan, dan stres [35]. Namun, berat badan mencit kembali naik pada hari-hari berikutnya, menunjukkan pemulihan nafsu makan yang normal. Pada pemeriksaan indeks organ (jantung, paru-paru, lambung, hati, dan ginjal), uji ANOVA menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan dalam bobot organ antara kelompok plasebo dan kelompok perlakuan. Analisis data organ juga menunjukkan distribusi normal ($p > 0,05$). Kesimpulannya, tidak ada perbedaan signifikan dalam berat badan maupun bobot organ mencit antara kelompok plasebo dan kelompok perlakuan.

Indeks organ menjadi indikator penting dalam evaluasi efek toksik suatu bahan atau sampel uji terhadap organisme, meskipun tidak dijadikan standar untuk menilai kerusakan organ [19], [20]. Indeks organ memberikan gambaran umum apakah terjadi pembesaran atau penyusutan pada organ, dan perbandingan bobot organ dengan berat badan mencit digunakan untuk mencari indeks organ [20]. Data pada Tabel 15 menunjukkan rata-rata indeks organ untuk organ lambung, hati, ginjal, paru-paru, dan jantung dari semua kelompok uji.

Dari hasil pengamatan, terlihat bahwa kelompok dosis 2000 mg/kgBB menunjukkan berat organ paling kecil dibanding kelompok lain, yang mungkin disebabkan oleh penurunan berat badan pada kelompok ini. Pengujian statistik dengan uji ANOVA menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$), dan uji Post Hoc Tukey mengidentifikasi perbedaan signifikan pada indeks organ lambung dan hati pada satu mencit di dosis 5000 mg/KgBB. Hal ini mungkin terkait dengan usia, berat badan, makanan, atau efek toksik pada lambung yang dapat menyebabkan tukak lambung [28], [29].

Meskipun indeks organ hati dosis 5000 mg/KgBB tidak jauh berbeda dengan kelompok plasebo, terlihat perbedaan dengan kelompok dosisnya. Perubahan ini dapat disebabkan oleh cedera pada sel hati, mengakibatkan penyerapan air yang menyebar hingga organel dan sitoplasma, menyebabkan pembengkakan sel dan peningkatan indeks organ [19]. Sedangkan, organ paru-paru, jantung, dan ginjal tidak menunjukkan perbedaan berarti pada indeks organ.

Pemeriksaan makroskopis pada semua kelompok uji menunjukkan organ-organ tersebut dalam keadaan normal, kecuali pada dosis 5000 mg/kgBB, di mana satu mencit mati dan terjadi perubahan pada bentuk paru-paru, dugaan karena gagal pernafasan. Namun, pengamatan makroskopis pada sisa hewan uji dari dosis 5000 mg/KgBB menunjukkan organ normal, menunjukkan bahwa perubahan bentuk organ mungkin



terjadi karena faktor fisiologis bukan akibat sediaan uji. Dalam keseluruhan, dapat disimpulkan bahwa sediaan minyak atsiri biji pala tidak memberikan pengaruh yang signifikan pada organ-organ mencit secara makroskopis.

Minyak atsiri pala, yang menjadi fokus utama penelitian ini, dapat dikategorikan sebagai sampel yang relatif tidak toksik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan minyak atsiri pala dalam dosis yang diberikan tidak menimbulkan efek samping yang serius pada subjek uji. Namun, perlu dicatat bahwa penelitian ini juga memiliki beberapa kekurangan. Penelitian ini terbatas pada dosis tertentu, dan informasi lebih lanjut mungkin diperlukan untuk memahami efek pada dosis yang lebih tinggi atau lebih rendah. Durasi penelitian tidak mencakup efek jangka panjang dari paparan minyak atsiri pala. Oleh karena itu, untuk penelitian selanjutnya, disarankan untuk memperluas cakupan dosis dan memperpanjang durasi penelitian guna mendapatkan pemahaman yang lebih komprehensif tentang potensi dampak minyak atsiri pala. Selain itu, penelitian selanjutnya dapat mengeksplorasi tingkat toksisitas dari senyawa-senyawa yang aktif dalam minyak atsiri pala dan interaksi minyak atsiri pala dengan faktor-faktor lingkungan lainnya yang dapat mempengaruhi respons tubuh secara lebih holistik.

5. KESIMPULAN

Minyak atsiri pala memiliki LD_{50} yang lebih dari dosis 5000 mg/kgBB, menunjukkan ketidaktoksikan praktis. Namun, gejala toksisitas dan kerusakan organ lambung dan hati pada dosis 5000 mg/KgBB menunjukkan adanya efek toksik minyak atsiri biji pala pada mencit.

6. DAFTAR PUSTAKA

- [1] E. Istriningsih, K. Khoirunnisa, and D. I. Kurnianingtyas, "Efek Antidepresan Kombinasi Infusa Biji Pala (*Myristica fragrans*) dan Daun Kemangi (*Ocimum basilicum*) pada Mencit Jantan Putih (*Mus musculus*)," *Parapemikir J. Ilm. Farm.*, vol. 7, no. 2, p. 256, 2018, doi: 10.30591/pjif.v7i2.926.
- [2] I. N. Hasanusi, P. Y. Silalahi, J. B. Bension, L. B. S. Huwae, and W. Ony, "Hasil Penelitian EFEK PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL BIJI PALA (*Myristica fragrans* Houtt) TERHADAP ANSIETAS MENCIT (*Mus musculus*) EFFECTS OF ETHANOL EXTRACT OF NUTMEG SEEDS (*Myristica fragrans* Houtt) ON MICE ANXIETY 1 Mahasiswa Fakultas Kedokteran Univers," *Pattimura Med. Rev.*, vol. 2, no. 1, pp. 36–46, 2020, [Online]. Available: file:///C:/Users/HP/Downloads/1590-Article Text-7996-1-10-20200501.pdf
- [3] N. 'Aini Hidayah, H. M. Ansory, P. K. K. Putri, and A. Nilawati, "Analisis Senyawa Minyak Atsiri Fuli Pala Secara GC-MS dan Uji Aktivitas Antibakteri Terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*," *Maj. Farm.*, vol. 13, no. 2, p. 56, 2018, doi: 10.22146/farmaseutik.v13i2.40915.
- [4] D. P. Wibowo, Y. Febriana, H. Riasari, and D. L. Aulifa, "Essential Oil Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities of Nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt) from Garut West Java," *Indones. J. Pharm. Sci. Technol.*, vol. 5, no. 3, p. 82, 2018, doi: 10.24198/ijpst.v5i3.16030.
- [5] S. E. Sudradjat, "Pala ; dari Obat Tradisional ke Obat Modern," *J. Kedokt. Meditek*, vol. 23, no. 62, pp. 77–82, 2017, [Online]. Available: <http://ejournal.ukrida.ac.id/ojs/index.php/Meditek/article/view/1557>
- [6] E. A. Abourashed and A. T. El-Alfy, "Chemical diversity and pharmacological significance of the secondary metabolites of nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.),"



- Phytochem. Rev.*, vol. 15, no. 6, pp. 1035–1056, 2016, doi: 10.1007/s11101-016-9469-x.
- [7] T. H. E. Effect, O. F. Extract, E. Nutmeg, and T. O. The, “PENGARUH EKSTRAK ETANOL BIJI PALA (*Myristica fragan* Houtt) TERHADAP JUMLAH GELIATAN MENCIT BALB / C YANG DIINJEKSI ASAM ASETAT 0 , 1 % UNIVERSITAS DIPONEGORO TAHUN 2010,” 2010.
- [8] H. M. Ansory, H. Sastrohamidjoyo, and B. Purwono, “Perbandingan Kualitas Minyak Pala Hasil Isolasi Dari Bagian-Bagian Buah Pala Berdasarkan Kadar Miristisin,” *J. Farm. Indones.*, vol. 12, no. 2, pp. 127–136, 2015.
- [9] S. Ketaren, S. Ngudiwaluyo, and A. Friyadi, “ISOLASI MIRISTISIN DARI MINYAK PALA (*Myristica fragrans*) DENGAN METODE PENYULINGAN UAP,” *J. Agroindustrial Technol.*, vol. 17, no. 1, pp. 23–28, 2007.
- [10] R. Astuti, “Pengaruh Waktu Distilasi Minyak Biji Pala (*Myristica fragrans*) dengan Metode Distilasi Uap dan Identifikasi Komponen Kimiawi,” *Indones. J. Lab.*, 2019, doi: 10.22146/ijl.v1i2.44741.
- [11] A. D. Gupta, V. K. Bansal, V. Babu, and N. Maithil, “Chemistry, antioxidant and antimicrobial potential of nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt),” *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, vol. 11, no. 1. pp. 25–31, 2013. doi: 10.1016/j.jgeb.2012.12.001.
- [12] H. M. Ansory, I. N. Fitriani, and A. Nilawatii, “Chemical Separation and Antibacterial Activity of Nutmeg seed Essential Oil against *Shigella* sp. and *Escherichia coli* ATCC 25922,” *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.*, vol. 846, no. 1, 2020, doi: 10.1088/1757-899X/846/1/012005.
- [13] T. D. Ayunani, I. T. Hastuti, H. M. Ansory, and A. Nilawati, “Pemisahan Senyawa 1,4-terpineol dan Safrol dari Minyak Atsiri Biji Pala (*Myristica Fragrans* Houtt) dan Uji Aktivitas Antibakteri Terhadap *Shigella dysenteriae*,” *J. Farm. Indones.*, 2019, doi: 10.31001/jfi.v15i1.357.
- [14] H. Muhamad Ansory, P. Khania Kusuma Putri, A. Hidayah, and A. Nilawati, “The Analysis of Nutmeg Mace Essential Oil Compound Using GC-MS and Antibacterial Activity Test Toward *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*,” *Maj. Farm.*, vol. 16, no. 1, pp. 1–8, 2020, doi: 10.22146/farmaseutik.v16i1.35985.
- [15] A. Rahmasari, “Formulasi dan Karakterisasi Nanoemulsi Minyak Atsiri Daun Pala (*Myristica fragrans* Houtt) serta Uji Toksisitas dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT),” Universitas Jenderal Soedirman, 2023. [Online]. Available: <http://www.nber.org/papers/w16019>
- [16] F. Polii, “PENELITIAN PENYULINGAN MINYAK PALA ”SIAUW” METODE UAP BERTEKANAN DAN KARAKTERISTIK MUTU MINYAK PALA,” *J. Penelit. Teknol. Ind.*, 2018, doi: 10.33749/jpti.v8i1.1301.
- [17] S. G. Sipahelut and I. Telussa, “Karakteristik Minyak Atsiri Dari Daging Buah Pala Melalui Beberapa Teknologi Proses Characteristic of the Essential Oil of Fruit Nutmeg By Some Process Technology,” *J. Teknol. Has. Pertan.*, 2011.
- [18] Kemenkes RI, *FARMAKOPE HERBAL INDONESIA*, II. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017. doi: 10.1201/b12934-13.
- [19] F. Ubang, V. O. Siregar, and H. Herman, “Efek Toksik Pemberian Ekstrak Etanol Daun Mekai (*Albortisia papuana* Becc.) Terhadap Mencit,” *Proceeding Mulawarman Pharm. Conf.*, vol. 16, no. November 2022, pp. 49–57, 2022, doi:



- 10.25026/mpc.v16i1.672.
- [20] S. Amal, N. S. Gunarti, D. S. Saragih, and H. Hidayah, "Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Daun Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) pada Mencit Betina Dengan Metode Fixed Dose.," *J. Pharmacopolium*, vol. 5, no. 2, pp. 190–198, 2022, doi: 10.36465/jop.v5i2.912.
- [21] C. S. Sulastra, K. Khaerati, and I. Ihwan, "Toksisitas Akut dan Lethal Dosis (LD50) Ekstrak Etanol Uwi Banggai Ungu (*Dioscorea alata* L.) pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)," *J. Ilm. Medicam.*, vol. 6, no. 1, pp. 2356–4818, 2020.
- [22] C. Eistanislau *et al.*, "Rat self-grooming and its relationships with anxiety, dearousal and perseveration: Evidence for a self-grooming trait," *Physiol. Behav.*, vol. 209, no. April, p. 112585, 2019, doi: 10.1016/j.physbeh.2019.112585.
- [23] C. A. Calhoun, C. Lattouf, V. Lewis, H. Barrientos, and S. T. Donaldson, "Chronic mild stress induces differential depression-like symptoms and c-Fos and 5HT1A protein levels in high-anxiety female Long Evans rats," *Behav. Brain Res.*, vol. 438, no. November 2022, p. 114202, 2023, doi: 10.1016/j.bbr.2022.114202.
- [24] D. D. Wisudanti, F. Herdiana, and T. S. Qodar, "Diazinon Toxicity to Kidney and Liver of Wistar Male Rats in terms of Biochemical and Histopathological Parameters," *J. Agromedicine Med. Sci.*, vol. 5, no. 2, p. 51, 2019, doi: 10.19184/ams.v5i2.11575.
- [25] NTP, Niehs, Nih, and DHHS, "Toxicity Report 95: NTP Technical Report on the Toxicity Studies of Myristicin (CASRN 607-91-0) Administered by Gavage to F344/NTac Rats and B6C3F1/N Mice," no. March, 2019, [Online]. Available: <https://manticore.niehs.nih.gov/cebssearch>.
- [26] Y. Hao, H. Ge, M. Sun, and Y. Gao, "Selecting an appropriate animal model of depression," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 19, pp. 1–16, 2019, doi: 10.3390/ijms20194827.
- [27] T. D. Gould, D. T. Dao, and C. E. Kovacsics, "Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice," *Neuromethods*, vol. 42, no. March 2009, pp. 1–20, 2009, doi: 10.1007/978-1-60761-303-9.
- [28] B. Srinivasan, T. E. Johnson, R. Lad, and C. Xing, "Structure - Activity relationship studies of chalcone leading to 3-hydroxy-4,3',4',5'-tetramethoxychalcone and its analogues as potent nuclear factor κB inhibitors and their anticancer activities," *J. Med. Chem.*, vol. 52, no. 22, pp. 7228–7235, 2009, doi: 10.1021/jm901278z.
- [29] E. C. Miller, A. B. Swanson, D. H. Phillips, A. Liem, J. A. Miller, and T. L. Fletcher, "Structure-activity studies of the carcinogenicities in the mouse and rat of some naturally occurring and synthetic alkenylbenzene derivatives related to safrole and estragole," *Cancer Res.*, vol. 43, no. 3, pp. 1124–1134, Mar. 1983.
- [30] J. C. Morales-Medina, N. Pugliese, A. Di Cerbo, C. Zizzadoro, and T. Iannitti, "Evidence for Endogenous Opioid Dependence Related to Latent Sensitization in a Rat Model of Chronic Inflammatory Pain," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 24, no. 3, 2023, doi: 10.3390/ijms24032812.
- [31] A. Nilawati and H. M. Ansory, "Aktivitas Antibakteri Pada Senyawa Turunan Kalkon Hasil Sintesis Dari Miristisin Buah Pala Antibacterial Activity of Kalkon Derivative Compounds from Miristisin Nutmeg Pendahuluan Indonesia negara penghasil pala terbesar didunia dengan total produksi 76 %," vol. 14, no. 2, pp. 154–159, 2017.
- [32] L. R. Agaus and R. V. Agaus, "Manfaat Kesehatan Tanaman Pala (*Myristica fragrans*) (Health Benefits of Nutmeg (*Myristica fragrans*))," *Medula*, vol. 6, no. 3, pp. 662–



- 666, 2019, doi: 10.46496/medula.v6i3.9648.
- [33] A. Nilawati, A. T. J. Atmajaningtyas, and H. M. Ansory, "The Influence of Myristicin Lost in Myristica Fragens Volatile Oils to Antimicrobial Activity Against B. Subtilis, E. Coli and S. Aureus," vol. 26, pp. 143–145, 2020, doi: 10.2991/ahsr.k.200523.035.
- [34] E. Denamur, O. Clermont, S. Bonacorsi, and D. Gordon, "The population genetics of pathogenic Escherichia coli," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 19, no. 1, pp. 37–54, 2021, doi: 10.1038/s41579-020-0416-x.
- [35] K. Saravanakumar *et al.*, "Chemical composition, antioxidant, and anti-diabetic activities of ethyl acetate fraction of Stachys riederi var. japonica (Miq.) in streptozotocin-induced type 2 diabetic mice," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 155, no. April, p. 112374, 2021, doi: 10.1016/j.fct.2021.112374.

