

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. Morfologi dan Taksonomi Biji Pala (*Myristica fragrans* Houtt.)

*Myristica fragrans* Houtt. atau yang lebih dikenal dengan nama pala merupakan tanaman rempah yang menghasilkan dua komoditas yaitu biji pala dan aril. Tanaman ini merupakan spesies asli dari kepulauan Maluku, Indonesia (Abourashed dan El-Alfy, 2016). Pohon pala dapat tumbuh setinggi 9 hingga 20 meter dengan tipe percabangan menyebar. Bunga dari pohon pala memiliki warna kuning pucat dengan panjang 1 cm. Bunga berkembang menjadi buah dengan ukuran 6 hingga 9 cm. Buah yang matang akan merekah dan memperlihatkan biji berwarna cokelat tua yang dilingkupi oleh aril berwarna merah berukuran 2,5 cm (de Guzman dan Siemonsma, 1999).

Biji yang telah dipisahkan dari arilnya dinamakan dengan pala. Pala yang telah dikeringkan akan berwarna cokelat tua (de Guzman dan Siemonsma, 1999). Biji pala diolah dengan cara dikeringkan terlebih dahulu dengan kadar air sebesar 12%. Setelah kering, biji akan berwarna cokelat, berbentuk telur dengan panjang 1,5 cm hingga 4,5 cm (Satuhu dan Yulianti, 2012). Pohon pala pada umumnya akan memproduksi buah pala sepanjang tahun, namun panen raya akan terjadi pada bulan April hingga November. Biji pala kering diparut dan digunakan untuk menambah cita rasa makanan, kue dan minuman. Aroma khas pala disebabkan karena adanya senyawa aromatik miristisin, elemisin, dan safrol (de Guzman dan Siemonsma, 1999).

Berikut ini adalah klasifikasi dan gambar skematis tanaman pala berdasarkan de Guzman dan Siemonsma, (1999) pada Gambar 1.

Kingdom : Plantae  
 Divisi : Tracheophyta  
 Kelas : Magnoliopsida  
 Ordo : Magnoliales  
 Famili : Myristicaceae  
 Genus : Myristica  
 Spesies : *Myristica fragrans* Houtt.



Gambar 1. *Myristica fragrans* Houtt. (1) Buah Pala (2) Bunga Pala (3) Kuncup Bunga (4) Biji pala dengan fuli (5) Biji Pala (6) Biji Pala yang dibelah melintang (Sumber: de Guzman dan Siemonsma, 1999).

Secara tradisional, biji pala digunakan untuk mengobati rematik, kolera, psikosis, kram perut, mual muntah, diare, diare, perut kembung dan sebagai antidepresan (Winarti dan Nurdjanah, 2005). Senyawa kimia yang terkandung dalam biji pala bergantung pada kondisi lingkungan tempat tumbuhnya, penyimpanan biji, usia biji dan metode analisis yang digunakan. Biji pala diolah

menjadi dua jenis yaitu mentega pala (*Nutmeg butter*) dan minyak esensial (Barceloux, 2009).

Biji pala dipanen dipanen setelah buahnya merekah dan telah jatuh dari pohonnya. Kemudian pala akan di keringkan selama seminggu dan cangkangnya akan dipecah. Terdapat tiga kualifikasi biji pala yaitu *sound*, *substandard* dan *distilling*. Kualitas *sound* adalah biji pala yang digunakan sebagai rempah – rempah halus dan ekstraksi oleoresin (Peter, 2001). Di Indonesia, pala dalam kualitas ini dibagi menjadi golongan ABCD sesuai dengan ukuran bijinya yaitu jumlah biji pala dalam 1 kilogram yaitu Besar yang terdapat 120 butir isi biji, Sedang yang terdapat 150 butir biji dan Kecil yang terdapat 200 butir biji (Dinar dkk., 2013).

Kemudian kualitas *substandard* yaitu biji pala yang digunakan sebagai rempah – rempah halus, ekstraksi oleoresin dan distilasi minyak atsiri. Biji pala kualitas ini memiliki kandungan minyak volatile yang lebih tinggi dan menghasilkan minyak atsiri sebanyak 8 – 10 %. Kemudian kualitas *distilling* yaitu biji pala dengan kualitas rendah yang umumnya digunakan dalam ekstraksi biji pala (Peter, 2001.)

## **B. Ekstraksi Minyak Atsiri Biji Pala (*Myristica fragrans* Houtt.)**

Minyak atsiri adalah cairan hidrofobik yang mengandung aroma khas dari tanaman. Minyak ini disebut juga dengan minyak esensial, minyak volatil, minyak etereal, ataupun minyak tanaman. Sebagai negara yang kaya akan bahan alam, Indonesia memiliki aneka ragam minyak esensial yang digunakan untuk berbagai tujuan seperti dalam pengobatan, penambah rasa ataupun sebagai

wewangian (Kementrian Perdagangan Republik Indonesia, 2011). Minyak atsiri didapatkan dengan melakukan penyulingan terhadap bahan tanaman, baik itu akar, kayu, batang, buah, daun dan bunga. Penyulingan adalah proses yang memisahkan komponen cair berdasarkan perbedaan titik uap yang dimilikinya. Terdapat 3 cara penyulingan minyak atsiri yaitu dengan penyulingan air, penyulingan uap dan air serta penyulingan dengan uap (Hayani dan Gani, 2002).

Penyulingan minyak atsiri dengan metode penyulingan air dilakukan dengan melakukan kontak langsung antara bahan yang akan disuling dengan air mendidih. Metode yang kedua adalah penyulingan dengan uap dan air yaitu bahan dan air dipisahkan dengan saringan yang terletak dekat dengan permukaan air dalam dandang distilasi, sehingga kontak yang terjadi hanya antara bahan dan uap. Metode ini memiliki ciri khas uap yang terbentuk basah, jenuh serta tidak terlalu panas. Metode yang terakhir adalah metode penyulingan dengan uap, metode ini mirip dengan metode penyulingan dengan uap dan air namun bahan dan air terletak pada ketel yang berbeda. Uap yang dihasilkan dari metode ini memiliki tekanan yang lebih tinggi. Penyulingan metode kedua (air dan uap) adalah metode yang paling sering dilakukan untuk skala kecil sedangkan metode ketiga (uap) dilakukan pada industri skala besar (Hayani dan Gani, 2002).

Menurut Kementrian Perdagangan Republik Indonesia (2011), secara umum, minyak atsiri pala didapatkan dengan metode distilasi air. Minyak pala memiliki warna bening sedikit kekuningan dengan kekuatan aroma sedang hingga kuat. Minyak pala memiliki deskripsi aroma yang kaya, pedas namun manis dengan sedikit rasa kayu, mirip dengan aroma rempah. Menurut Maya

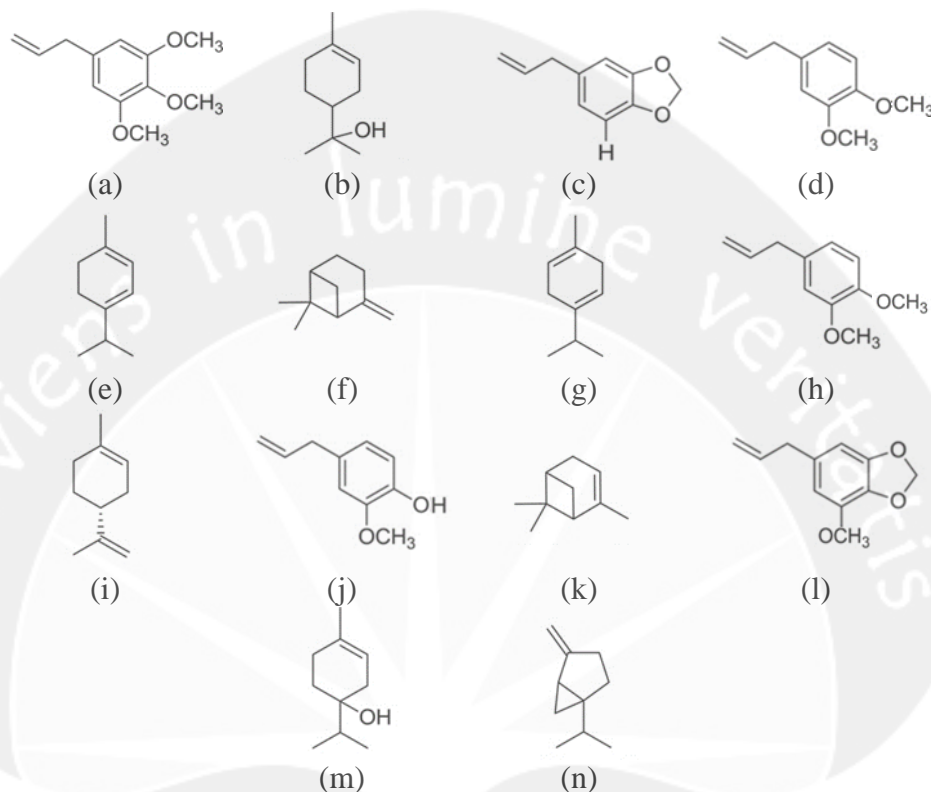
dkk., (2005) kandungan minyak atsiri dari biji pala adalah dari 3,9 hingga 16,5% dari berat kering biji pala (w/w).

### **C. Uji Senyawa Minyak Atsiri Biji Pala dengan Metode *Gas Chromatography* – *Mass Spectrometry* (GC-MS) dan Pengaruhnya**

GC atau *Gas Chromatography* merupakan metode analisis gas dan uap dari bahan dengan sifat volatil. Dasar pemisahan dengan metode GC berdasarkan waktu retensi masing-masing komponen individu saat bergerak melalui kolom (fase diam) oleh gas pembawa (fase gerak). Kolom (fase diam) yang digunakan umumnya terbentuk dari bahan metal atau kaca dan dipenuhi dengan bahan inert seperti *beads* kaca atau keramik sedangkan gas pembawa yang biasa digunakan adalah helium atau nitrogen (Al-Bukhaiti, dkk., 2017).

Sampel diinjeksikan melewati kolom GC yang merupakan metode pemisahan komponen yang paling unggul, kemudian dilanjutkan dengan *Mass Spectrometry* (MS) yang memberikan informasi tentang berat molekul dari bahan yang dianalisis. Kedua metode tersebut dikombinasi menjadi komponen kromatografi yang dinamakan GC-MS. Metode ini merupakan metode yang paling sering digunakan untuk melakukan analisis terhadap minyak atsiri. Metode GC-MS memiliki kelebihan yaitu dapat memisahkan komponen minyak atsiri yang paling kompleks dan dianalisis secara detail sehingga dapat diketahui komponen individual yang terkandung dalam minyak atsiri tersebut (Sneddon dkk, 2007).

Berikut ini adalah gambar struktur dari senyawa yang terkandung dalam minyak atsiri biji pala (*Myristica fragrans* Houtt.) pada Gambar 2.



Gambar 2. Struktur Senyawa Kimia pada Minyak Atsiri Biji Pala (*Myristica fragrans* Houtt.) (a) elemisin; (b)  $\alpha$ -terpineol; (c) safrol; (d) metileugenol; (e)  $\alpha$ -terpinene; (f)  $\beta$ -pinene; (g)  $\gamma$ -terpinene; (h) metiliso Eugenol; (i) limonene; (j) eugenol; (k)  $\alpha$ -pinene; (l) miristisin; (m) 4-terpineol; (n) sabinene (Sumber: Abourashed dan El – Alfy, 2016).

Minyak esensial biji pala (*Myristica fragrans* Houtt.) yang diuji dengan metode GC-MS menunjukkan adanya kurang lebih 34 jenis senyawa yang terkandung. Senyawa yang paling sering muncul adalah elemisin,  $\alpha$ -terpineol, safrol, metileugenol,  $\alpha$ -terpinene,  $\beta$ -pinene,  $\gamma$ -terpinene, metiliso Eugenol, limonene, eugenol,  $\alpha$ -pinene, miristisin, 4-terpineol, sabinene (Abourashed dan El – Alfy, 2016). Struktur senyawa tersebut dapat dilihat pada Gambar 2 di atas.

Eugenol dalam minyak atsiri biji pala (*Myristica fragrans* Houtt.) memiliki sifat menghambat terjadinya peroksidasi lipid serta memelihara aktivitas superoksida dismutase, katalase, glutathionin peroksidase, glutamin transferase dan glukosa-6-fosfat dehydrogenase (Sonavane dkk., 2002). Tiga senyawa khas utama yang terkandung dalam minyak atsiri biji pala (*Myristica fragrans* Houtt.) adalah miristisin, elemisin dan safrol yang ketiga senyawa tersebut merupakan senyawa turunan alkilbenzene (Beyer dkk., 2006).

Miristisin yang terkandung dalam minyak atsiri memiliki sifat sebagai Monoamine Oxidase Inhibitor (MAO-I) lemah dan memiliki struktur mirip dengan serotonin agonis yang akan meningkatkan aktivitas serotonin. Miristisin dapat menyebabkan terjadinya efek psikoaktif berupa halusinasi apabila dikonsumsi dalam dosis 1 hingga 2 mg atau sebanyak 5 gram bubuk biji pala (*Myristica fragrans* Houtt.). Efek tersebut diduga karena terjadinya metabolisme miristisin menjadi metilendioksiamphetamin (MMDA) yang merupakan derivat dari amphetamine (Rahman dkk., 2015). Reaksi pembentukan MMDA dapat dilihat pada Gambar 3.

Elemisin yang merupakan salah satu dari derivat alkilbenzene dimetabolisme menjadi 3,4,5 trimetoksiamphetamin (TMA) yang ikut berperan dalam terjadinya efek halusinogenik (Stein dkk., 2001). Namun, miristisin tetap berperan lebih kuat dalam terjadinya halusinasi (Rahman dkk., 2015). Reaksi metabolisme yang terjadi dapat dilihat pada Gambar 4.





hilangnya energi untuk beraktivitas, vii) munculnya perasaan tidak berguna, viii) hilangnya kemampuan untuk berpikir, berkonsentrasi serta membuat keputusan, dan yang terakhir ix) tercetus niat untuk mengakhiri hidupnya (Brigitta, 2002).

Depresi adalah fenomena kompleks yang dapat disebabkan oleh berbagai hal mulai dari pengaruh genetik, trauma masa kecil, tekanan kondisi lingkungan hingga karena faktor ketidakseimbangan jumlah neurotransmitter pada tubuh yang bertanggung jawab dalam mengatur suasana hati seperti serotonin dan nonepinefrin (Moinuddin dkk., 2012).

Hewan uji adalah model yang sangat penting untuk menyelidiki etiologi depresi, sekaligus berperan dalam kemajuan pengembangan pengobatan terapeutik efektif. Namun, meskipun penggunaan hewan uji berpengaruh besar dalam mempelajari kelainan psikiatrik, tetap saja mereka memiliki beberapa batasan. Sebagai contoh, hewan tidak mampu menunjukkan perasaan bersalah, bersedih dan tidak memiliki keinginan untuk mengakhiri hidupnya yang sesungguhnya tiga hal tersebut merupakan ciri khas depresi pada manusia (Abelaira, dkk., 2013)

Permasalahan utama dalam penggunaan hewan uji sebagai model adalah keabsahannya dalam pengujian. Terdapat tiga kriteria atau validitas yang pada pengujian depresi menggunakan hewan uji sebagai berikut

1. Validitas Muka: Perilaku yang ditunjukkan oleh hewan uji harus serupa dengan tanda – tanda yang diamati oleh individu dengan depresi.
2. Validitas Konstruk: Perubahan patofisiologis yang terjadi pada individu dengan depresi seperti adanya perubahan aksis pada HPA (Hipotalamik –

Pituitari – Adrenal), atrofi hipokampus serta neurotransmitter harus terjadi pula pada hewan model.

3. Validitas prediktif: Perilaku yang ditunjukkan oleh hewan model harus dapat diubah dengan menggunakan pengobatan yang efektif yaitu dengan terapi antidepresan ataupun terapi elektrokonvulsif.

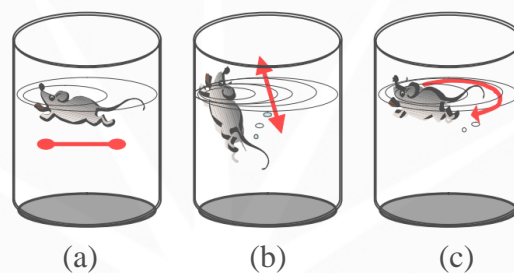
Berdasarkan ketiga validitas tersebut dikembangkan banyak pengujian menggunakan hewan uji. Salah satu pengujian antidepresan yang sudah banyak dilakukan adalah pengujian *Forced Swim Test* (FST). FST memenuhi validitas prediktif sehingga dapat digunakan sebagai metode untuk mengetahui ada atau tidaknya aktivitas antidepresan sebuah senyawa (Abelaira, dkk., 2013).

#### **E. Pengujian *Forced Swim Test* (FST) pada Mencit (*Mus musculus L.*)**

Pada tahun 1954, obat antidepresan ditemukan karena keberuntungan yaitu adanya peningkatan kualitas hidup pada penderita tuberculosis (TBC) setelah meminum obat. Obat iproniazid yang digunakan untuk mengobati TBC ternyata juga memiliki efek antidepresan. Obat tersebut kemudian menjadi obat antidepresan pertama dalam golongan *Monoamine Oxidase Inhibitor* (MAO-I). Penemuan tersebut memulai pencarian dan penelitian obat atau bahan yang dapat digunakan sebagai antidepresan (Petit-Demouliere, dkk., 2005).

Tahun 1977, Porsolt, dkk., menemukan sebuah pengujian yang dapat digunakan untuk mengetahui efek antidepresan dari suatu obat atau bahan pada hewan uji mencit yaitu dengan membuat mencit tersebut masuk dalam kondisi depresi. Pengujian ini muncul karena adanya perilaku mencit yang hanya mengambang diam saat dilakukan pengujian labirin air. Pengujian ini dilakukan

dengan cara memberikan sediaan uji satu jam sebelum dilakukannya pengujian, kemudian mencit dimasukkan dalam tabung silinder dengan tinggi 25 cm dan diameter 10 cm yang diisi dengan air setinggi  $\pm 10$  cm. Mencit dibiarkan dalam tabung tersebut selama 6 menit, kemudian durasi postur imobil dihitung 4 menit setelah 2 menit pertama. Mencit disebut imobil ketika sudah menyerah untuk menyelamatkan diri dari tabung air dan hanya melakukan gerakan minimal untuk menjaga agar kepala tetap berada di atas permukaan air (Porsolt dkk., 1977). Ilustrasi perilaku mencit dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Karakteristik Perilaku dalam *Forced Swim Test* (FST) (a) Postur Imobil; (b) Memanjat; (c) Berenang (Sumber: Yuman dkk., 2008).

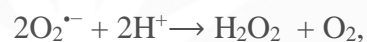
Pengujian antidepresan harus menunjukkan kemiripan respon depresi depresi antara hewan uji dan respon depresi yang terjadi pada manusia. Depresi merupakan kondisi klinis yang terjadi karena pengaruh dari gejala psikologis, neuroendokrin, dan somatik yang tidak dapat ditiru oleh hewan uji dan khususnya mencit. Sampai sekarang pengujian antidepresan menggunakan hewan uji masih terus didesain, diuji dan dievaluasi. Namun, pengujian *Forced Swim Test* (FST) sekarang ini adalah model uji yang paling populer karena berbiaya relatif lebih rendah dan memberikan hasil yang dapat dipercaya (Petit-Demouliere, dkk., 2005).

Fluoxetine adalah salah satu obat antidepresan pertama dalam golongan *Selective Serotonin Reuptake Inhibitor* (SSRI) dan menjadi obat yang digunakan dalam penelitian antidepresan secara ekstensif. Fluoxetine akan memengaruhi jumlah kadar serotonin dengan menghambat reseptor inhibitor serotonin sehingga jumlahnya akan meningkat. Dosis terapeutik fluoxetine yang diberikan pada mencit akan meningkatkan aktivitas berenang dan mempersingkat durasi postur imobil (Arndt dkk., 2015).

Pada pengujian *Forced Swim Test* (FST) terdapat tiga gerakan khas yang ditunjukkan oleh mencit yaitu memanjat, berenang dan postur imobil. Durasi perilaku tersebut yang akan membedakan pengaruh dari senyawa atau bahan yang diberikan. Antidepresan secara umum akan mengurangi durasi postur imobil, golongan antidepresan *Norepinephrine Selective Reuptake Inhibitors* (NSRIs) dan *Tricyclic Antidepressant* (TCA) akan meningkatkan aktivitas memanjat yang ditunjukkan dengan mencit mencoba memanjat dinding tabung dan golongan *Selective Serotonin Reuptake Inhibitors* (SSRIs) akan meningkatkan aktivitas berenang. Namun, stimulan seperti kafein juga mampu meningkatkan periode memanjat, perbedaannya adalah aktivitas berenang dari stimulan akan terus tinggi sedangkan antidepresan akan mengurangi durasi postur imobil namun mencit tidak terus berenang sepanjang periode pengujian (Costa, dkk., 2013).

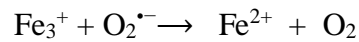
## F. Pengaruh Stress Oksidatif pada Depresi

*Reactive Oxygen Species* atau ROS adalah senyawa radikal yang terbentuk dari reduksi parsial oksigen (Ray dkk., 2012). ROS terbentuk secara alami sebagai produk samping metabolisme normal sel (Behr dkk., 2012). Reduksi molekul oksigen ( $O_2$ ) dalam tubuh menghasilkan superoksida ( $O_2^-$ ), ion tersebut merupakan ROS primer. Superoksida menyebabkan terjadi reaksi berantai membentuk ROS sekunder secara langsung atau melalui proses yang dikatalis oleh enzim maupun metal.  $O_2^-$  dapat menerima satu atau dua proton untuk membentuk struktur yang lebih stabil yaitu  $H_2O_2$  secara enzimatik dengan enzim SOD (superoksida peroksidase) ataupun secara nonenzimatis. Menurut Sharma dkk., (2012) reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut;

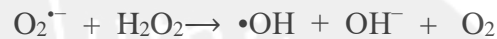


Tidak seperti ROS lainnya,  $H_2O_2$  tidak memiliki elektron bebas sehingga dapat melewati membran biologis dan membuat kerusakan oksidatif jauh dari lokasi terbentuknya, misalnya pada mitokondria. Pada konsentrasi  $10 \mu M$   $H_2O_2$  menurunkan aktivitas enzim pada daur Calvin yaitu pada enzim fructose-1,6-bisphosphatase, sedoheptulose-1,7-bisphosphatase dan phosphoribulokinase sebesar 50% (Sharma dkk., 2012).

Kerusakan sel tidak disebabkan oleh  $O_2^{\bullet-}$  dan  $H_2O_2$ , namun oleh hasil konversi molekul tersebut menjadi spesies yang lebih reaktif yaitu  $\bullet OH$  melalui reaksi Haber-Weiss dan reaksi Fenton. Menurut Sharma dkk., (2012) reaksi Haber-Weiss membentuk  $\bullet OH$  dari  $H_2O_2$  dan  $O_2^{\bullet-}$  melalui dua reaksi berikut:

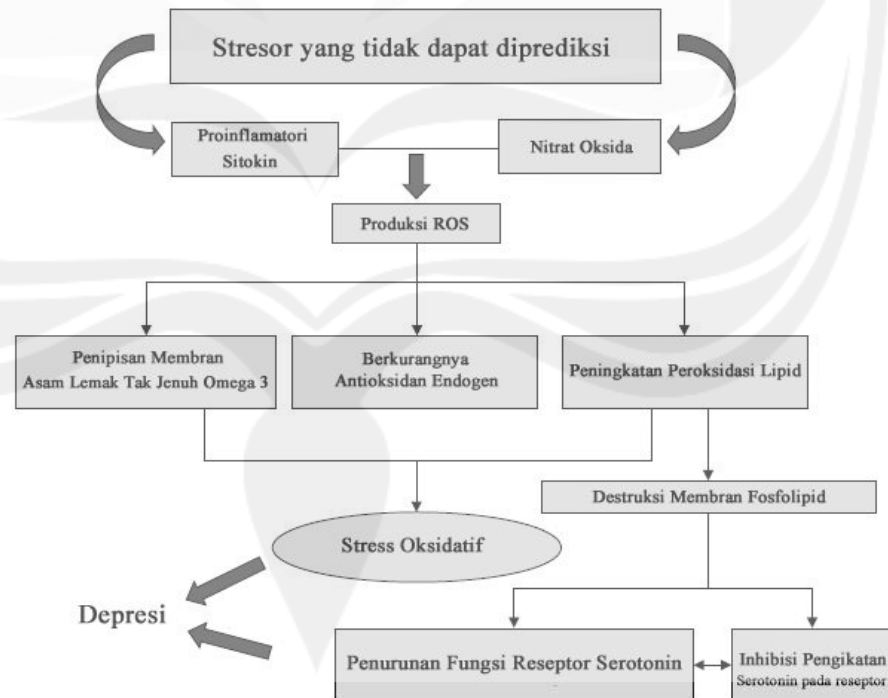


Menurut Sharma dkk., (2012),  $\text{Fe}^{3+}$  dan  $\text{O}_2^{\bullet-}$  akan di oksidasi oleh dihidrogen peroksida pada reaksi Fenton sebagai berikut:



Hidroksida reaktif atau  $\bullet\text{OH}$  mampu berinteraksi dengan seluruh molekul biologi dan menyebabkan kerusakan sel seperti peroksidasi lipid, kerusakan protein dan destruksi membran yang kemudian dapat menyebabkan depresi (Sharma dkk., 2012).

Secara skematik peran ROS yang mengakibatkan terjadinya depresi dapat dilihat pada Gambar 6 berikut:



Gambar 6. Skematik peran ROS dalam terjadinya depresi (Sumber: Scapagnini dkk., 2012)

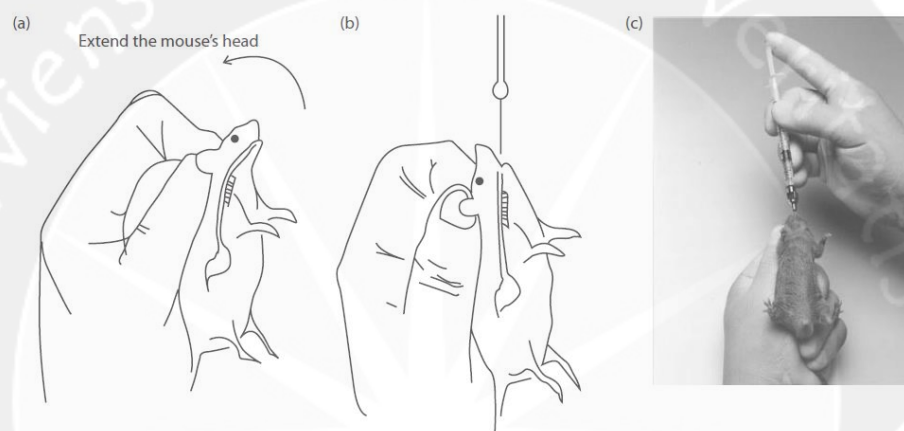
ROS dalam tubuh secara efektif dikontrol dan dieleminasi oleh antioksidan, apabila ROS yang diproduksi oleh tubuh tidak seimbang dengan antioksidan maka akan terbentuk situasi yang dinamakan dengan stress oksidatif (Salim, 2014). Otak menjadi organ yang paling rentan terhadap stress oksidatif karena menggunakan oksigen sebanyak 20% dari total keseluruhan oksigen yang digunakan oleh tubuh (Clarke dan Sokoloff, 1999). Otak terdiri dari asam lemak tak jenuh yang dapat meningkatkan terjadinya peroksidasi lipid oleh ROS dan menyebabkan terjadinya depresi (Sarandol dkk., 2007).

Depresi juga dapat disebabkan karena aktivitas enzim Monoamine Oksidase (MAO) yang mengkatalisis deaminasi oksidatif neurotransmitter seperti serotonin, dapat menyebabkan diproduksinya  $H_2O_2$ , yang merupakan ROS, secara berlebih. Meningkatnya ROS dalam tubuh dapat memicu peroksidasi lipid yang akan menyebabkan rusaknya membran fosfolipid dan menurunkan fungsi reseptor serotonin serta menghambat pengikatan serotonin pada reseptor. Ketidakmampuan serotonin berikatan dengan reseptor akan menyebabkan terjadinya depresi (Scapagnini dkk., 2012).

#### **G. Mencit (*Mus musculus* Linn.) sebagai hewan model**

Mencit (*Mus musculus* L.) adalah hewan model yang digunakan secara luas untuk pengujian medis, farmakologi, toksitas, biologis dan genetik. Mencit digunakan dalam penelitian untuk menguji aktivitas antidepresan yang ditunjukkan secara perilaku dan biomarker. *Handling* atau perlakuan yang tepat kepada hewan uji akan mempengaruhi hasil yang didapatkan dari pengujian. Rute pemberian sediaan yang digunakan adalah secara peroral (Hedrich, 2004).

Pemberian secara peroral adalah rute pemberian yang paling sering digunakan, metode ini menggunakan jarum peroral dengan bola pada ujung jarumnya. Mencit dalam keadaan sadar diimobilisasi dengan cara memegang kulit bagian punggung sehingga mulut dan lambung menjadi satu garis lurus (Hedrich, 2004). Jarum peroral kemudian dimasukkan melalui mulut dan faring menuju esofagus seperti ilustrasi pada Gambar 7.



Gambar 7. Ilustrasi Prosedur Administrasi Peroral menggunakan Jarum Peroral (a) Pemanjangan leher (b) mulut dan perut membentuk satu garis lurus (c) injeksi menggunakan *syringe* 1 mL dengan jarum peroral 22G (Sumber: Hedrich, 2004).

Metode administrasi peroral harus memperhatikan beberapa hal yaitu volume sediaan yang diinjeksikan dan perilaku mencit saat dilakukan pemberian sediaan. Volume yang disarankan untuk administrasi peroral mencit adalah 0,2 ml sediaan. Jumlah tersebut telah disesuaikan dengan kapasitas lambung dari mencit (Hedrich, 2004).

Data yang didapatkan dari mencit dapat berupa data sampel tubuh ataupun dari pengamatan perilaku. Data sampel tubuh dapat menggunakan darah sebagai sumbernya. Darah mencit dapat diambil secara anestesi ataupun tanpa anestesi. Secara umum, sampel darah dapat diambil dari pembuluh darah vena,



arteri ataupun dari bilik jantung. Volume darah yang diambil tidak boleh melebihi 10% dari jumlah total darah yang mengalir dalam tubuh. Pada hewan kecil, volume darah yang dimiliki adalah 55 – 70 ml/kg berat badan, sehingga dari 20 gram berat badan mencit, volume darah yang bisa diambil adalah 1,1 – 1.4 ml (Parasuraman, dkk., 2010).

Pengambilan darah mencit dapat dilakukan dengan beberapa metode, salah satunya adalah menggunakan teknik sinus orbital. Volume darah yang dapat diambil dari sinus orbital adalah 0,2 – 1,0 ml. Darah diambil menggunakan tabung mikrohematokrit yang diposisikan pada kantung mata dibawah bola mata, dengan mengarahkan dengan sudut 45° tekan dengan lembut tabung mikrohematokrit hingga vena terbuka dan darah mengalir masuk ke tabung. Darah yang keluar ditampung dalam tabung eppendorf bersih (Hoff, 2000).

Darah yang diperoleh kemudian diinkubasi dalam suhu ruang 27°C selama 30 menit hingga terbentuk koagulan dan kemudian dilakukan sentrifugasi sehingga didapatkan serum darah. Serum adalah fase cair dari darah yang sudah tidak memiliki sel darah maupun faktor koagulan dan masih harus memiliki komponen molekul yang menggambarkan keadaan seluruh sistem darah. Serum didapatkan dengan melakukan sentrifugasi dengan suhu 4°C kemudian disimpan dalam suhu -4°C hingga saatnya digunakan untuk pengujian (Tuck dkk., 2009).

Spesimen serum darah dapat disimpan dalam suhu -4°C hingga -20°C sesuai dengan lama penyimpanan yang dilakukan. Kandungan senyawa dalam serum darah stabil pada suhu -20°C hingga penyimpanan selama 3 minggu.

Namun, tidak terdapat perbedaan signifikan pada pengaruh suhu penyimpanan apabila pengujian dilakukan dibawah masa simpan 3 minggu (Kumar dkk, 2012).

Faktor yang memengaruhi kualitas hasil pengujian spesimen atau sampel darah menurut Tuck dkk., (2009) adalah:

1. Jenis senyawa aditif yang digunakan dalam tabung koleksi darah.
2. Waktu atau lama pengujian yang dilakukan dan temperatur pengujian.
3. Hemolisis sampel.
4. Keadaan penyimpanan sampel.
5. Siklus pembekuan dan pelumeran sampel.

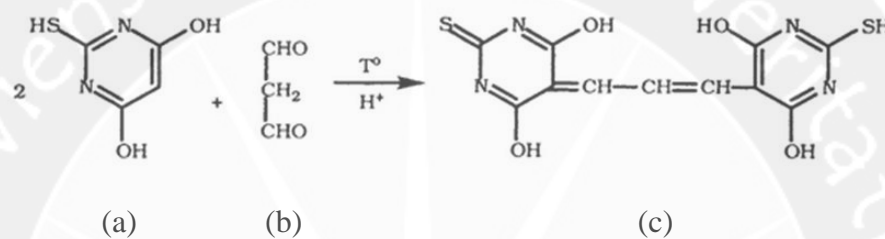
Berikut ini adalah klasifikasi mencit menurut Fox dkk. (2006),

Kingdom	:	Animalia
Filum	:	Chordata
Class	:	Mammalia
Ordo	:	Rodentia
Famili	:	Muridae
Genus	:	Mus
Species	:	<i>Mus musculus</i> L.

#### **H. Pengujian *Thiobarbituric Acid Reactive Substances* (TBARS)**

ROS atau *Reactive Oxidative Substances* memiliki sifat sangat reaktif sehingga tidak dapat dikuantifikasi secara langsung, sehingga aktivitasnya dihitung berdasarkan jumlah produk peroksidasi lipid yang terbentuk yaitu Malondialdehid atau MDA (Behr dkk., 2012). Malondialdehid (MDA) adalah senyawa dalam golongan aldehid yang terbentuk ketika terjadi peroksidasi lipid pada sistem biologis. MDA dapat dikuantifikasi menggunakan uji

*Thiobarbituric Acid Reactive Substances* (TBARS), uji ini dilakukan berdasarkan pembentukan warna merah muda (*pink chromogen*) yang terjadi pada reaksi antara TBA (*Thiobarbituric Acid*) dan MDA. Warna merah yang terbentuk diuji secara kolorimetri menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 532 nm (Garcia dkk., 2005). Pembentukan *pink chromogen* menurut Atta-ur-Rahman, (2000) terjadi karena reaksi pada Gambar 8.



Gambar 8. Reaksi pembentukan *pink chromogen* (a) TBA, *Thiobarbituric Acid* (b) MDA, Malondialdehid (c) (TBA)<sub>2</sub>MDA *pink chromogen* (Sumber: Atta-ur-Rahman, 2000).

## I. Hipotesis

1. Minyak atsiri biji pala (*Myristica fragrans* Houtt.) memengaruhi waktu imobilitas dan kadar Malondialdehid (MDA) pada mencit *Mus musculus* L.
2. Dosis minyak atsiri biji pala (*Myristica fragrans* Houtt.) yang memiliki aktivitas optimum sebagai antidepresan pada mencit *Mus musculus* L. adalah 10 mg/kg.