

Efek Imunomodulasi Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cacao* L) terhadap Aktivitas dan Kapasitas Fagositosis Sel Makrofag Peritoneum Mencit yang Diinfeksi Bakteri *Staphylococcus epidermidis*  
(*The Immunomodulation Effect of Ethanolic Extract of Cocoa Beans (*Theobroma cacao* L) on Activities and Capacities of Mice Peritoneal Macrophages Infected by *Staphylococcus epidermidis* Bacteria*)

I Wayan Suardita, Diana Chusna Mufida, Misnawi  
Fakultas Kedokteran, Universitas Jember  
Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Jember  
e-mail: [suardita.wayan@gmail.com](mailto:suardita.wayan@gmail.com)

**Abstract**

*Cocoa beans (*Theobroma cacao* L) has been reported to stimulate immune response. Twenty Swiss Webster mice were divided into 5 equal groups. The first control group (negative control), received aquadest. The second control group (positive control), was given meniran extract (*Phyllanthus niruri*). The case group: group III received 0,23 mg/gr BW ethanolic extract of cocoa beans, group IV received 0,46 mg/gr BW, and group V received 0,92 mg/grBW. These were injected orally on day 1 until 7. On day 8, *Staphylococcus epidermidis* (SE) were injected intraperitoneally. The macrophages activities were counted on slide smears of mice peritoneal fluid by calculating the percentage of phagocytes which perform phagocytosis of 100 phagocytic cells. Phagocytic capacity was determined by the number of SE that phagocytosis by 50 phagocytic active cells. According to enhancement of dose, either the macrophages activities and capacities were found. The highest activity and capacity was achieved by the highest dose of ethanolic extract of cocoa beans ( $85\pm 8,23\%$  and  $511\pm 8,93$ ). It can be concluded that ethanolic extract of cocoa beans increased phagocytosis activities and capacities of macrophages.*

**Keywords:** *Cocoa beans, macrophages, Swiss Webster mice, *Staphylococcus epidermidis**

**Abstrak**

Biji Kakao (*Theobroma cacao* L) telah dilaporkan memiliki potensi untuk merangsang respon imun. Duapuluh ekor mencit *Swiss Webster* dibagi ke dalam 5 kelompok. Kelompok kontrol negatif (group I) mendapatkan akuades, kontrol positif (group II) mendapatkan ekstrak meniran (*Phyllanthus niruri*). Sedangkan kelompok perlakuan: group III mendapatkan 0,23 mg/gr BB ekstrak etanol biji kakao, group IV 0,46 mg/gr BB dan dan group V 0,92 mg/gr BB. Ekstrak diberikan sejak hari pertama hingga ke tujuh. Pada hari ke delapan, masing-masing mencit diinjeksi bakteri *Staphylococcus epidermidis* (SE) secara intraperitoneal. Aktivitas sel makrofag dihitung dari sediaan apus cairan peritoneum mencit dengan menghitung

persentase fagosit yang melakukan fagositosis dari 100 sel fagosit. Kapasitas fagositosis ditetapkan berdasarkan jumlah SE yang difagositosis oleh 50 sel fagosit aktif. Aktivitas dan kapasitas fagositosis meningkat seiring dengan peningkatan dosis ekstrak etanol biji kakao. Aktivitas dan kapasitas tertinggi dicapai oleh dosis ekstrak etanol biji kakao tertinggi ( $85\pm 8,23\%$  dan  $511\pm 8,93$ ). Dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol biji cacao dapat meningkatkan aktivitas dan kapasitas fagositosis sel makrofag.

**Kata kunci:** Biji kakao, makrofag, mencit *Swiss Webster*, *Staphylococcus epidermidis*

## Pendahuluan

Tanaman kakao (*Theobroma cacao* L) banyak tumbuh di perkebunan-perkebunan di Indonesia. Indonesia adalah produsen kakao terbesar ketiga setelah Pantai Gading dan Ghana dengan produksi tahunan mencapai 833.313 ribu ton [1]. Dewasa ini, kakao dan coklat tidak hanya dipandang sebagai bahan pangan yang dinikmati karena cita rasanya yang digemari. Kandungan polifenol dalam kakao banyak diteliti dalam kaitannya dengan kesehatan, hal ini disebabkan aktivitas antioksidan yang ditunjukkan polifenol kakao. Polifenol kakao khususnya kelompok flavonoid diketahui secara signifikan mempengaruhi produksi beberapa jenis sitokin, yaitu senyawa ekstraselular yang berfungsi menyampaikan sinyal dari satu sel ke sel lainnya. Kehadiran sitokin inilah yang mempengaruhi aktivitas sistem imun.

Lingkungan di sekitar manusia mengandung berbagai jenis unsur patogen, misalnya bakteri, virus, fungus, protozoa dan parasit yang dapat menyebabkan infeksi pada manusia. Infeksi yang terjadi pada manusia umumnya singkat dan jarang meninggalkan kerusakan permanen. Hal ini disebabkan tubuh manusia memiliki suatu sistem yaitu sistem imun yang melindungi tubuh terhadap unsur-unsur patogen [2]. Salah satu upaya yang dilakukan sistem imun non-spesifik dalam mempertahankan diri terhadap masuknya antigen yaitu dengan cara menghancurkan antigen melalui proses fagositosis. Sel-sel yang berperan dalam memfagositosis antigen antara lain sel makrofag [3].

Efek imunomodulasi kakao dalam bentuk ekstrak etanol atau coklat kaya polifenol pada manusia secara langsung belum banyak dilaporkan, padahal dampak positif konsumsi coklat telah banyak diketahui. Dilaporkan bahwa konsumsi coklat secara kontinu selama lebih dari tiga hari, dapat meningkatkan angka kualitas hidup terkait kesehatan (*Health-Related Quality of Life*) pada penderita kanker [4]. Konsumsi harian 100 gram coklat yang mengandung 500 mg polifenol dapat meningkatkan sensitivitas insulin dan menurunkan resistansi insulin, sekaligus menurunkan tekanan darah sistolik [5].

Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan secara ilmiah adanya efek imunomodulator ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L) melalui sistem kekebalan nonspesifik (aktivitas dan kapasitas fagositosis sel makrofag). Disamping itu juga untuk mengetahui nilai toksisitas akut dari ekstrak etanol biji kakao.

## Metode

### Hewan coba

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit *Swiss Webster* berumur 8-12 minggu dengan berat 25-35 gram. Sebelum digunakan sebagai hewan percobaan, semua mencit dipelihara terlebih dahulu selama kurang lebih satu minggu untuk penyesuaian lingkungan, mengontrol kesehatan dan berat badan serta menyeragamkan makanannya.

### Pembuatan ekstrak

Pembuatan ekstrak etanol biji kakao diawali terlebih dahulu pemilihan buah kakao. Buah kakao yang digunakan adalah yang jenis kakao lindak matang. Setelah biji kakao dipisahkan dengan dagingnya (*pulp*), biji kakao kemudian dikeringkan, diblender dan diayak, kemudian dimeserasi dengan etanol 90%. Setelah mendapatkan bubuk ekstrak etanol biji kakao, dilakukan analisis total polifenol.

### Analisis total polifenol

Kandungan total polifenol dianalisis dengan menggunakan metode *Follin-ciocalteu*. Sebanyak 0.05 ml ekstrak kakao dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian 1 ml etanol, 5 ml aquades, 0.5 ml reagen *follin-ciocalteu* (50 %) ditambahkan ke dalam tabung reaksi dan divortek. Setelah 5 menit, ke dalam tabung reaksi tersebut ditambahkan 1 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (5%) dan divortek agar larutan homogen. Reaksi campuran dibiarkan di tempat gelap dengan cara dibungkus menggunakan aluminium foil selama 60 menit untuk kemudian diukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang 725 nm. Kurva standar dibuat dengan cara yang sama dengan mengganti sampel dengan asam galat yang dibuat dalam beberapa konsentrasi. Kandungan total polifenol dalam ekstrak kakao dinyatakan dalam mg/ml sampel.

### Penetapan $\text{LD}_{50}$

Uji toksisitas akut ( $\text{LD}_{50}$ ) ekstrak etanol biji kakao dilakukan dengan metode Weil C.S, dengan menggunakan 9 mencit betina yang dibagi menjadi 3 kelompok dengan dosis 0,65 mg/grBB, 1,3 mg/grBB, 2,6 mg/grBB. Pemberian ekstrak etanol biji kakao melalui jalur pemberian peroral.

### Kultur *Staphylococcus epidermidis*

Bakteri uji *Staphylococcus epidermidis* ditumbuhkan dalam medium pertumbuhan MHM, diinkubasi selama 24 jam dengan temperatur 37° C. Setelah 24 jam masa inkubasi, *S.epidermidis* telah tumbuh dan berkembang biak, ambil koloninya yang tumbuh dengan menggunakan ose steril dan pindahkan ke dalam medium NB cair secara aseptik,

inkubasikan pada suhu 37° C selama 24 jam. Kemudian disentrifuge selama 1 jam dengan kecepatan 100 rpm. Cairan supernatant yang terbentuk pada bagian atas tabung reaksi dibuang [6]-[7].

#### Pemberian Ekstrak Etanol Biji Kakao

Mencit dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan, yaitu 2 kelompok sebagai kelompok kontrol positif (K+) dan kontrol negatif (K-) serta 3 kelompok perlakuan. Kontrol positif disini diberikan ekstrak meniran dan kontrol negatif diberikan akuades. Kelompok P1 adalah mencit yang mendapat 50% (0,23 mg/grBB) dosis kelompok P2 berdasarkan konversi dari manusia ke mencit. Kelompok P2 adalah mencit yang mendapat dosis 100% (0,46 mg/grBB) berdasarkan konversi manusia ke mencit. Kelompok P3 adalah mencit yang mendapat 200% (0,92 mg/grBB) dosis dari kelompok P2 berdasarkan konversi manusia ke mencit. Masing-masing kelompok dicobakan pada 4 ekor mencit. Pada hari pertama hingga ke tujuh, mencit dicekok per oral.

#### Analisis Fagositosis Makrofag

Pada hari ke 8, mencit pada masing-masing kelompok diinfeksi dengan bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan disuntikkan intra peritoneal kemudian dibiarkan selama 1 jam. Mencit dieutanasi dan dibedah kemudian ditambahkan 0,5 ml PBS ke intraperitoneal mencit. Cairan peritoneum diambil dengan menggunakan semprit 1 ml. Cairan peritoneum tersebut dibuat preparat apus dan difiksasi dengan metanol absolut selama 5 menit, diwarnai dengan Giemsa, didiamkan selama 20 menit, dibilas dengan air dan dikeringkan. Preparat dilihat di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x. Aktivitas dan kapasitas fagositosis sel makrofag dihitung. Aktivitas fagositosis ditetapkan berdasarkan persentase fagosit yang melakukan fagositosis dari 100 fagosit. Kapasitas fagositosis ditetapkan berdasarkan jumlah *S. epidermidis* yang difagositosis oleh 50 fagosit aktif.

#### Analisis Data

Untuk mengetahui adanya perbedaan pengaruh ekstrak etanol biji kakao dari berbagai dosis terhadap aktivitas dan kapasitas fagositosis sel makrofag digunakan uji *Kruskal-Wallis* yang dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*.

## Hasil Penelitian

#### Uji Toksisitas Akut

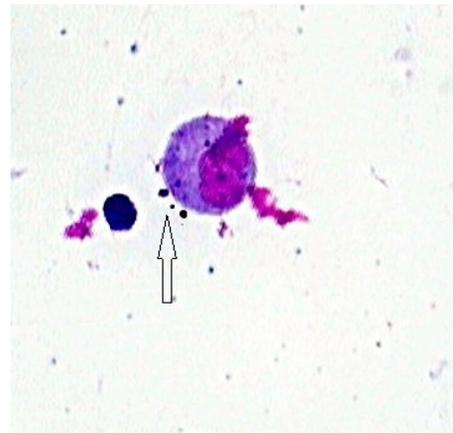
Hasil pengamatan uji kuantitatif selama 24 jam, berupa jumlah mencit mati, ditunjukkan dalam tabel di bawah ini.

Tabel 1. Jumlah mencit mati 24 jam setelah pemberian ekstrak biji kakao dosis tunggal

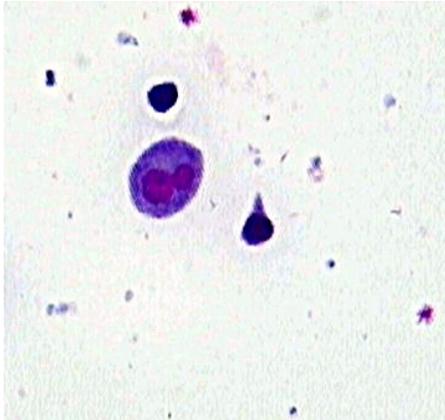
Kelompok	Perlakuan	Jumlah Sampel	Jumlah mencit mati
P1	0,65 mg/grBB ekstrak biji kakao	3	0
P2	1,3 mg/grBB ekstrak biji kakao	3	0
P3	2,6 mg/grBB ekstrak biji kakao	3	0

Dari hasil yang didapat, tidak terdapat mencit yang mati, dari seluruh kelompok.

#### Gambar uji imunomodulasi



Gambar 1. Sel makrofag aktif yang sedang memfagosit bakteri *S. epidermidis* (tanda panah)

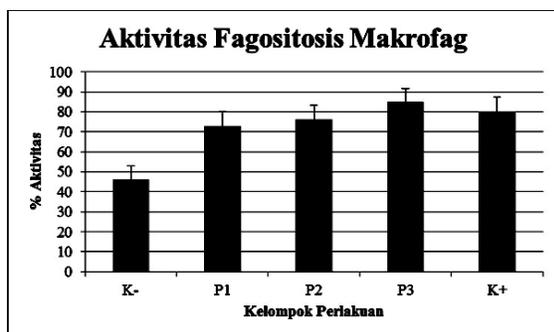


Gambar 2. Sel makrofag tidak aktif

### Aktivitas fagositosis

Tabel 2. Nilai aktivitas fagositosis dalam 100 makrofag aktif

Kelompok Perlakuan	& Aktivitas			
	Pengulangan			
	I	II	III	Rata-rata ± SD
K-	51	41	46	46±15,09
P1	70	74	75	73±7,26
P2	73	79	77	76,33±7,4
P3	73	97	85	85±8,23
K+	83	77	81	80,33±3,05



Gambar 3. Kurva perbandingan aktivitas fagositosis sel makrofag

Tabel 3. Hasil analisis uji post hoc *Mann Whitney* aktivitas fagositosis sel makrofag

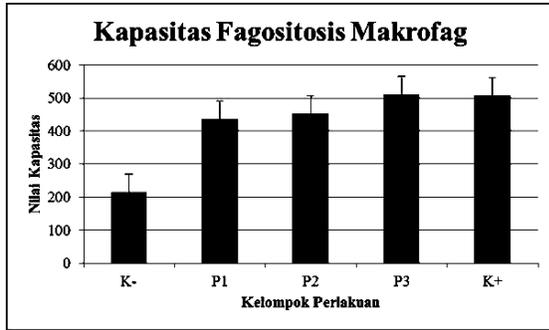
Kelompok	K-	P1	P2	P3	K+
K-	-	0,05	0,05	0,05	0,05
P1	0,05	-	0,275	0,28	0,05
P2	0,05	0,275	-	0,376	0,05
P3	0,05	0,28	0,376	-	0,827
K+	0,05	0,05	0,05	0,827	-

$\alpha < 0,05$

### Kapasitas fagositosis

Tabel 4. Nilai kapasitas fagositosis makrofag dalam 50 makrofag aktif

Kelompok Perlakuan	Kapasitas			
	Pengulangan			
	I	II	III	Rata-rata ± SD
K-	238	189	220	215,67±40,2
P1	427	441	444	437,33±34,5
P2	452	449	456	452,33±29,09
P3	509	518	506	511±8,93
K+	494	518	507	506,33±12,01



Gambar 4. Kurva perbandingan kapasitas fagositosis sel makrofag

Tabel 5. Hasil analisis uji post hoc *Mann Whitney* kapasitas fagositosis sel makrofag

Kelompok	K-	P1	P2	P3	K+
K-	-	0,05	0,05	0,05	0,05
P1	0,05	-	0,05	0,05	0,05
P2	0,05	0,05	-	0,05	0,05
P3	0,05	0,05	0,05	-	0,658
K+	0,05	0,05	0,05	0,658	-

$\alpha < 0,05$

### Pembahasan

Penelitian awal ditujukan untuk mengetahui nilai LD<sub>50</sub> dari ekstrak etanol biji kakao, dengan pemberian secara intraperitoneal. Dari hasil penelitian, tidak ada satu pun mencit yang mati setelah dilakukan perlakuan. Jika dosis maksimal tidak menimbulkan kematian hewan coba, maka LD<sub>50</sub> dinyatakan dengan LD<sub>50</sub> 'semu' dengan mengambil dosis maksimal [8]. Bila pada dosis maksimal pada penelitian tidak ada kematian pada hewan coba, maka jelas senyawa tersebut termasuk dalam kriteria "Praktis Tidak Toksik" [8].

Penelitian selanjutnya adalah pengamatan aktivitas makrofag. Aktivitas makrofag paling rendah dijumpai pada kelompok kontrol akuades, diikuti oleh kelompok perlakuan I dan II. Aktivitas meningkat seiring dengan peningkatan dosis ekstrak etanol biji kakao. Aktivitas tertinggi dicapai oleh dosis tertinggi dan kontrol positif ekstrak meniran (Tabel 2). Peningkatan aktivitas makrofag seiring dengan tingginya dosis, menunjukkan bahwa terdapat

bahan aktif yang terkandung dalam ekstrak etanol biji kakao yang berpotensi untuk meningkatkan aktivitas makrofag.

Telah diinformasikan sebelumnya, bahwa ekstrak etanol biji kakao mengandung flavonoid yang cukup tinggi. Pada penelitian bahan alam lain yang mengandung flavonoid, seperti meniran (*Phyllanthus niruri* L.) memiliki kemampuan dalam memperbaiki sistem imun [9]-[10]. Berarti, hasil penelitian ini sesuai dengan harapan, yakni hipotesis terbukti, dengan kata lain bahwa bahwa ekstrak etanol biji kakao memiliki potensi bekerja sebagai imunostimulan. Flavonoid berpotensi bekerja terhadap limfokin yang dihasilkan oleh sel T sehingga akan merangsang sel-sel fagosit untuk melakukan respon fagositosis.

Hasil penelitian mengenai kapasitas makrofag, juga menunjukkan bahwa masing-masing dosis menunjukkan kapasitas fagositosis yang berbeda. Makin tinggi dosis pemberian ekstrak etanol biji kakao, makin tinggi pula kapasitasnya. Kapasitas fagositosis tertinggi didapatkan pada dosis 0,92 mg/grBB. Hasil ini menunjukkan bahwa memang betul terjadi peningkatan kapasitas makrofag selain peningkatan aktivitas makrofag yang telah diuraikan di atas. Berarti pula bahwa makin tinggi dosis, makin banyak sel bakteri yang difagosit oleh satu sel makrofag. Hal ini menunjukkan bahwa, dosis yang disarankan untuk digunakan sebagai imunostimulator adalah dosis tertinggi.

### Simpulan dan Saran

LD<sub>50</sub> dari ekstrak etanol biji kakao adalah LD<sub>50</sub> 'semu' karena belum didapatkan LD<sub>50</sub> yang sesungguhnya. Pemberian ekstrak etanol biji kakao meningkatkan aktivitas dan kapasitas fagositosis sel makrofag. Dosis yang disarankan untuk digunakan sebagai imunostimulator adalah dosis tertinggi. Pada dosis tertinggi dalam penelitian ini, memiliki aktivitas dan kapasitas lebih tinggi dibanding ekstrak meniran sekalipun.

### Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih kepada Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Jember yang telah menyediakan dana untuk penelitian ini, sehingga penelitian ini bisa berjalan dengan lancar.

### Daftar Pustaka

- [1]. Indonesia. Standar Operasional Prosedur Penetapan Kebun Sumber Benih Sertifikasi Benih Dan Evaluasi Kebun Sumber Benih Tanaman Kakao (*Theobroma cacao*)

- L.). Peraturan Menteri Pertanian Nomor 90/Permentan/OT.140/9/2013. Berita Negara Republik Indonesia Tahun 2013 Nomor 1143.
- [2]. Roit IM, Brostoff J, Male J. Immunology. 3rd ed. St Louis Mosby Co; 1993.
- [3]. Hana Ratnawati, Yudhi Handoko G, Leonard H. Purba. Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Merah (Pandanus conoideus Lam.) terhadap Aktivitas Fagositosis Makrofag: Juli 2007. JKM. Vol. (7) No.1: 01-14.
- [4]. Wong, S.Y, PL Lua. Effects of dark chocolate consumption on anxiety, depressive symptoms and health related quality of life status among cancer patients. Health and Environment Journal. 2012: (3): 27-35.
- [5]. Grassi, D. C. Lippi, S. Necozione, G. Desideri, and C. Ferri. Short-term administration of dark chocolate is followed by a significant increase in insulin sensitivity and a decrease in blood pressure in healthy persons American Journal of Clinical Nutrition. 2005: 81: 611-614.
- [6]. Chairul. Phagocytosis Effectivity Test of Phenylbutenoid Compounds Isolated from Bangle (Zingiber cassumuna Roxb.) Rhizome. Journal of Biological Diversity. 2009 10 (1): 40-43.
- [7]. Ranjith MS. Enhanced Phagocytosis and Antibody Production by *Tinosporacordifolia* – A new dimension in Immunomodulation. African Journal of Biotechnology. 2008: 7 (2): pp. 081-085.
- [8]. Nurlaila, Donatus IA, Sugiyanto, Wahyono D, Suhardjono D. Petunjuk Praktikum Toksikologi. 1st ed. Yogyakarta: Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi Fakultas Farmasi, Universitas Gajah Mada; 1992. hal. 3 – 5, 16 – 30.
- [9]. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan; Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia; 2000. hal: 9-11.
- [10]. Syamsuhidayat SS, dan Hutapea JR. Inventaris Tanaman Obat Indonesia, Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia; 1991. hal: 124-5.