



**UJI EFEKTIVITAS ANALGESIK EKSTRAK KULIT KAKAO  
(*Theobroma cacao L.*) TERHADAP *LICKING TIME* MENCIT  
YANG DIINDUKSI FORMALIN**

**SKRIPSI**

Oleh

**Yuli Lusiana Sari**

**NIM 142010101084**

**FAKULTAS KEDOKTERAN**

**UNIVERSITAS JEMBER**

**2017**



**UJI EFEKTIVITAS ANALGESIK EKSTRAK KULIT KAKAO  
(*Theobroma cacao L.*) TERHADAP *LICKING TIME* MENCIT  
YANG DIINDUKSI FORMALIN**

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan di Fakultas Kedokteran (S1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran

Oleh

**Yuli Lusiana Sari**

**NIM 142010101084**

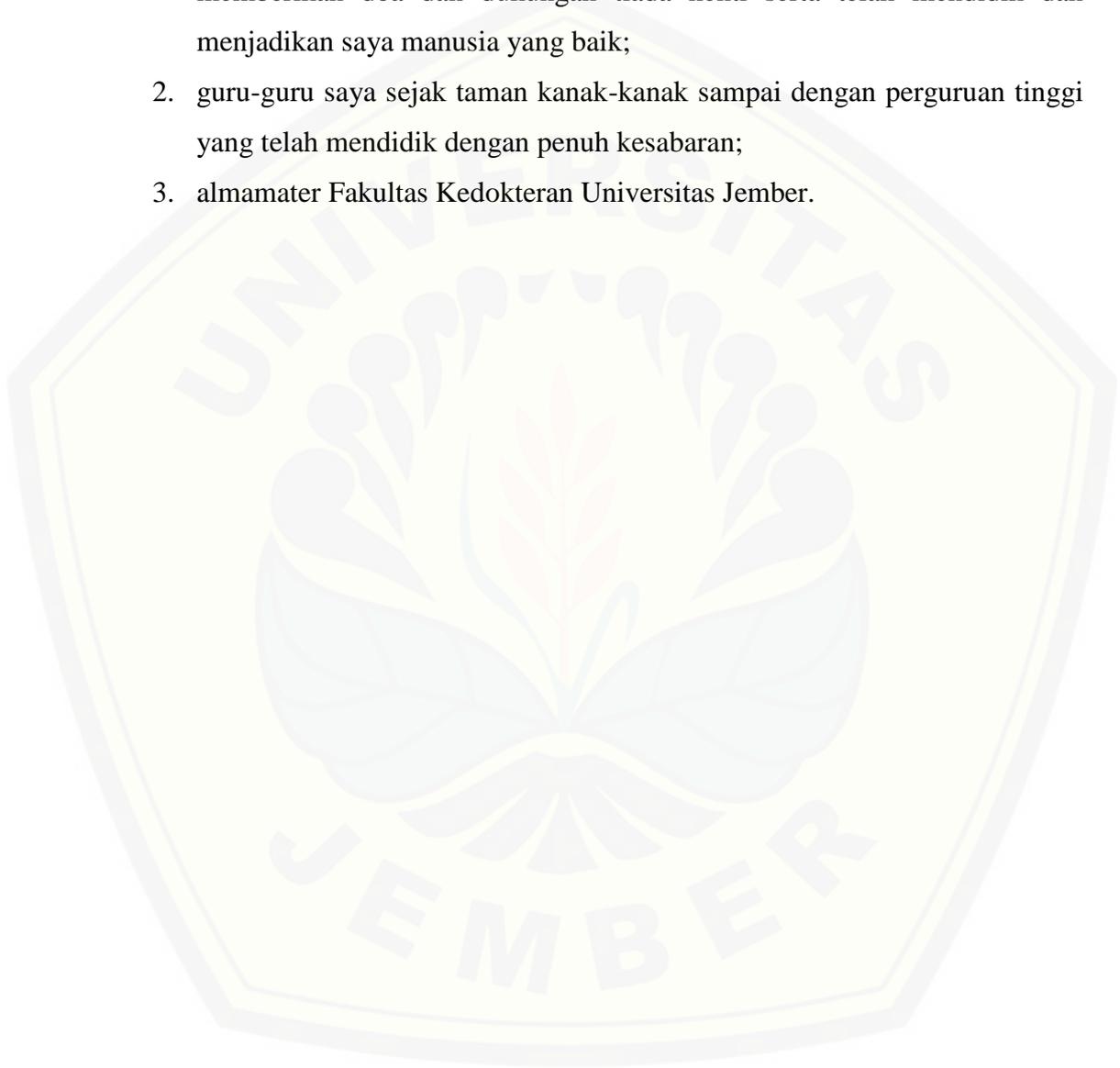
**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2017**

**PERSEMBAHAN**

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. kedua orang tua saya, Bapak Hientoro dan Ibu Sri Sari yang senantiasa memberikan doa dan dukungan tiada henti serta telah mendidik dan menjadikan saya manusia yang baik;
2. guru-guru saya sejak taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi yang telah mendidik dengan penuh kesabaran;
3. almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.



**MOTO**

“sesungguhnya Allah tidak akan mengubah keadaan suatu kaum sehingga mereka mengubah keadaan yang ada pada diri mereka.” (Terjemahan Q.S Ar ra’d 11)\*)



---

\*) \*\*) Departemen Agama Republik Indonesia. 1981. Al Qur'an dan Terjemahannya.

Semarang: PT Kumudasmoro Grafindo

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

nama : Yuli Lusiana Sari

NIM : 142010101084

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah saya yang berjudul “Uji Efektivitas Analgesik Ekstrak Kulit Kakao (*Theobroma Cacao L.*) terhadap *Licking Time* Mencit yang Diinduksi Formalin” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata pernyataan ini tidak benar.

Jember, Desember 2017

Yang menyatakan,

Yuli Lusiana Sari

NIM 142010101084

**SKRIPSI**

**UJI EFEKTIVITAS ANALGESIK EKSTRAK KULIT KAKAO  
(*Theobroma cacao L.*) TERHADAP *LICKING TIME* MENCIT  
YANG DIINDUKSI FORMALIN**

Oleh

Yuli Lusiana Sari  
NIM 142010101084

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : dr. Desie Dwi Wisudanti, M. Biomed

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Muhammad Ali Shodikin, M. Kes, Sp. A

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Uji Efektivitas Analgesik Ekstrak Kulit Kakao (*Theobroma Cacao L.*) terhadap *Licking Time* Mencit yang Diinduksi Formalin” karya Yuli Lusiana Sari telah diuji dan disahkan pada :

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

**Tim Penguji :**

Ketua,

dr. Cicih Komariah, Sp.M  
NIP 197409282005012001

Anggota II,

dr. Desie Dwi W., M. Biomed  
NIP 198212112008122002

Anggota I,

Dr.dr. Yunita A., M.Kes  
NIP 197406042001122002

Anggota III,

dr. M. Ali Shodikin, M. Kes, Sp. A  
NIP 197706252005011002

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Dr. Enny Suswati, M.Kes  
NIP 197002141999032001

## RINGKASAN

**Uji Efektivitas Analgesik Ekstrak Kulit Kakao (*Theobroma cacao L.*) terhadap *Licking Time* Mencit yang Diinduksi Formalin ; Yuli Lusiana Sari, 142010101084; 2017; 51 halaman; Jurusan Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember.**

Analgesik merupakan istilah medis yang digunakan untuk suatu bahan yang dapat mengurangi nyeri tanpa menyebabkan hilangnya kesadaran (Dorland, 2012). Penggunaan analgesik *Non Steroidal Anti Inflammatory Drugs* (NSAID) jangka panjang dapat menyebabkan efek samping ringan seperti mual dan dispepsia (prevalensi sekitar 50-60%) dan komplikasi yang lebih serius seperti penyakit tukak peptik (3-4%) yang menyebabkan pendarahan atau perforasi pada 1,5% pengguna NSAID per tahun. Kematian akibat komplikasi tukak peptik diperkirakan mencapai sekitar 20.000 setiap tahun (Valle, 2005).

Jember merupakan salah satu tempat pusat industri dan pusat penelitian kakao di Indonesia (Depperin, 2007). Kondisi tersebut sangat mendukung adanya kegiatan penelitian tentang pemanfaatan kakao (*Theobroma cacao L.*). *Theobroma cacao L* merupakan bahan industri yang sering dimanfaatkan sebagai bahan pembuatan cokelat, namun bagian yang dimanfaatkan dari tanaman tersebut adalah biji sehingga bagian kulit kakao menumpuk sebagai limbah (Depperin, 2007), yaitu mencapai 75% dari total produksi (Wahyudi *et al.*, 2008). Berdasarkan uraian di atas, peneliti bermaksud untuk menguji efektivitas analgesik ekstrak kulit kakao dilihat dari akumulasi waktu yang dibutuhkan untuk respons menjilat (*licking time*) mencit yang diinduksi formalin.

Penelitian ini merupakan *quasi experimental laboratories* dengan rancangan penelitian, yaitu *post test only control group design*. Penelitian ini menggunakan sampel berjumlah 28 ekor mencit yang diambil dari populasinya dengan cara *simple random sampling*. Pada penelitian ini dilakukan adaptasi selama tujuh hari dan perlakuan selama 1 hari, bertempat di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Mencit dikelompokkan

menjadi tujuh kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif (K(-)) diberikan NaCMC 1% peroral, kontrol positif (K(+)) diberikan natrium diklofenak 0,0048 mg/gBB peroral, kelompok K1, K2, K3, K4, dan K5 diberikan ekstrak kulit kakao 0,25 mg/gBB, 0,5 mg/gBB, 1 mg/gBB, 2 mg/gBB, dan 4 mg/gBB peroral. 30 menit setelah induksi peroral, seluruh mencit diinjeksi dengan 200 µl formalin 2,5% pada kaki belakang secara subkutan. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak kulit kakao sedangkan variabel terikatnya adalah *licking time* mencit. Analisis data yang digunakan adalah uji *One Way Annova* untuk mengetahui perbedaan *licking time* mencit antar kelompok. Uji *Post Hoc* yaitu *Games-Howell* untuk mengetahui kelompok yang berbeda signifikan.

Hasil penelitian menunjukkan rata-rata *licking time* mencit kelompok K(-) sebesar 4,00 detik pada fase pertama dan 201,75 detik pada fase kedua, kelompok K(+) sebesar 3,00 detik pada fase pertama dan 45,5 detik pada fase kedua, kelompok K1 sebesar 3,00 detik pada fase pertama dan 40,00 detik pada fase kedua, kelompok K2 sebesar 1,25 detik pada fase pertama dan 37,75 detik pada fase kedua, kelompok K3 sebesar 1,25 detik pada fase pertama dan 12,00 detik pada fase kedua, kelompok K4 sebesar 4,00 detik pada fase pertama dan 54,00 detik pada fase kedua serta kelompok K5 sebesar 2,00 detik pada fase pertama dan 60,75 detik pada fase kedua. Hasil uji normalitas *Shapiro Wilk* pada data *licking time* fase pertama dan kedua menunjukkan data terdistribusi normal ( $p>0,05$ ). Uji homogenitas menunjukkan varians data *licking time* fase pertama homogen ( $p>0,05$ ) sedangkan fase kedua heterogen ( $p<0,05$ ). Hasil analisis *One Way ANOVA* menunjukkan bahwa perbedaan antar kelompok pada data *licking time* fase pertama tidak signifikan ( $p>0,05$ ) sedangkan pada data fase kedua signifikan ( $p<0,05$ ). Uji *Post Hoc Games-Howell* data *licking time* fase kedua menunjukkan bahwa kelompok K(-) berbeda signifikan dengan kelompok K1, K2, dan K3. Kesimpulan penelitian ini adalah ekstrak kulit kakao dapat menurunkan *licking time* fase kedua mencit yang diinduksi formalin secara signifikan, namun tidak menurunkan *licking time* fase pertama secara signifikan. Pada dosis tertentu, persentase inhibisi ekstrak kulit kakao terhadap *licking time* mencit lebih besar daripada natrium diklofenak.

## PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Uji Efektivitas Analgesik Ekstrak Kulit Kakao (*Theobroma Cacao L.*) terhadap *Licking Time* Mencit yang Diinduksi Formalin”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada :

1. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
2. dr. Enny Suswati, M.Kes selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember atas segala fasilitas dan kesempatan yang diberikan selama menempuh pendidikan kedokteran di Universitas Jember;
3. dr. Desie Dwi Wisudanti, M.Biomed selaku Dosen Pembimbing Utama dan dr. Muhammad Ali Shodikin, M.Kes, Sp.A selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga, dan perheparannya dalam penulisan tugas akhir ini;
4. dr. Cicih Komariah, Sp.M dan Dr. dr. Yunita Armiyanti, M.Kes sebagai dosen penguji yang banyak memberikan kritik, saran, dan masukan yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
5. Mbak Lilik, Pak Madi, dan Mbak Nuris yang telah memberikan berbagai bantuan dan dukungan dalam penelitian ini;
6. Bapak Hientoro dan Ibu Sri Sari, orang tua tercinta atas kasih sayang, dukungan moril, materi, doa dan pengorbanan;
7. Bapak Jong, Paman tercinta atas kasih sayang, dukungan moril, materi, doa dan pengorbanan;
8. Riesa Yuni Pangestuti dan Nur Hidha Setyaningih sebagai saudara kandung saya yang selalu memberikan dukungan dan doa;
9. Teman kerja saya, Faradila Praginta yang telah membantu dan selalu memberikan dorongan serta semangat selama penelitian;

10. Rifqia Zahara, Ferry Fitriya A.A, Nihayah Lukman, Herlin Karismaningtyas, Shofi Iqda Islami, Trinita D.P, Dita P.D, Mega C.P, Amalia N.Z, dan Aprilia T.F sebagai sahabat yang selalu memberikan semangat dan doa untuk saya;
11. Teman-teman angkatan 2014 tercinta yang telah berjuang bersama-sama demi sebuah gelar Sarjana Kedokteran;
12. Semua pihak yang telah memberikan bantuan dan dukungan dalam penyusunan skripsi ini yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari semua pihak demi kesempurnaan karya tulis ilmiah ini. Semoga karya tulis ini dapat bermanfaat.

Jember, Desember 2017

Penulis

**DAFTAR ISI**

	Halaman
<b>HALAMAN SAMPUL</b> .....	i
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	ii
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	iii
<b>HALAMAN MOTO</b> .....	iv
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	v
<b>HALAMAN BIMBINGAN</b> .....	vi
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vii
<b>RINGKASAN</b> .....	viii
<b>PRAKATA</b> .....	x
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xv
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xvi
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xvii
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	3
<b>1.3 Tujuan Penelitian</b> .....	3
1.3.1 Tujuan Umum.....	3
1.3.2 Tujuan Khusus.....	3
<b>1.4 Manfaat Penelitian</b> .....	3
1.4.1 Manfaat bagi Peneliti.....	3
1.4.2 Manfaat bagi Institusi .....	3
1.4.3 Manfaat bagi Ilmu Pengetahuan .....	4
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	5
<b>2.1 Analgesik</b> .....	5
2.1.1 Analgesik Opioid.....	5
2.1.2 Analgesik Non-opioid .....	8
<b>2.2 Nyeri</b> .....	11

<b>2.3</b>	<b><i>Theobroma cacao L.</i></b> .....	14
2.3.1	Klasifikasi Umum.....	14
2.3.2	Morfologi Umum.....	14
2.3.3	Kandungan Kimia dan Aktivitas Kakao dalam Proses Inflamasi.....	15
<b>2.4</b>	<b><i>Paw Licking Test</i></b> .....	17
<b>2.5</b>	<b>Kerangka Teori</b> .....	19
<b>2.6</b>	<b>Kerangka Konseptual</b> .....	20
<b>2.7</b>	<b>Hipotesis</b> .....	21
<b>BAB 3.</b>	<b>METODE PENELITIAN</b> .....	22
<b>3.1</b>	<b>Jenis Penelitian</b> .....	22
<b>3.2</b>	<b>Rancangan Penelitian</b> .....	22
<b>3.3</b>	<b>Populasi dan Sampel Penelitian</b> .....	23
<b>3.4</b>	<b>Tempat dan Waktu Penelitian</b> .....	24
<b>3.5</b>	<b>Variabel Penelitian</b> .....	24
3.5.1	Variabel Bebas.....	24
3.5.2	Variabel Terikat.....	24
3.5.3	Variabel Terkendali .....	25
<b>3.6</b>	<b>Definisi Operasional</b> .....	25
3.6.1	Ekstrak Kulit Kakao ( <i>Theobroma cacao L.</i> ) .....	25
3.6.2	Natrium Diklofenak.....	25
3.6.3	NaCMC.....	26
3.6.4	Formalin.....	26
3.6.5	<i>Licking Time</i> .....	26
3.6.6	Persentase Inhibisi .....	26
<b>3.7</b>	<b>Alat dan Bahan Penelitian</b> .....	27
3.7.1	Alat Penelitian .....	27
3.7.2	Bahan Penelitian .....	27
<b>3.8</b>	<b>Prosedur Penelitian</b> .....	27
3.8.1	Uji Kelayakan Etik .....	27
3.8.2	Adaptasi Hewan Coba .....	28

3.8.3	Pemilihan Hewan Coba .....	28
3.8.4	Pembagian Kelompok Perlakuan.....	28
3.8.5	Pembuatan Ekstrak Kulit Kakao.....	29
3.8.6	Perlakuan pada Kelompok Sampel.....	30
3.8.7	Penginduksian Formalin .....	30
3.8.8	Pemeriksaan <i>Licking Time</i> .....	30
3.8.9	Perhitungan Persentase Daya Inhibisi .....	31
<b>3.9</b>	<b>Analisis Data</b> .....	31
<b>3.10</b>	<b>Alur Penelitian</b> .....	32
<b>BAB 4.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	33
<b>4.1</b>	<b>Hasil Penelitian</b> .....	33
4.1.1	Ekstrak Kulit Kakao .....	33
4.1.2	Uji Daya Analgesik .....	33
<b>4.2</b>	<b>Analisis Hasil Penelitian</b> .....	35
<b>4.3</b>	<b>Pembahasan</b> .....	37
4.3.1	Efektivitas Ekstrak Kulit Kakao terhadap <i>Licking Time</i> Fase Pertama.....	37
4.3.2	Efektivitas Ekstrak Kulit Kakao terhadap <i>Licking Time</i> Fase Kedua .....	40
<b>BAB 5.</b>	<b>PENUTUP</b> .....	43
<b>5.1</b>	<b>Kesimpulan</b> .....	43
<b>5.2</b>	<b>Saran</b> .....	43
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	.....	44
<b>LAMPIRAN</b>	.....	48

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
2.1 Komposisi kimia keping biji dan kulit biji kakao .....	15
2.2 Aktivitas ekstrak fenolik pada kakao dalam proses inflamasi pada sel kultur .....	16
3.1 Pembagian kelompok perlakuan .....	29
4.1 Rata-rata <i>licking time</i> mencit tiap kelompok pada fase pertama.....	34
4.2 Rata-rata <i>licking time</i> mencit tiap kelompok pada fase kedua .....	34
4.3 Hasil uji <i>Games-Howell</i> pada data <i>licking time</i> fase kedua .....	36

**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
2.1 Pelepasan mediator yang memproduksi sensitisasi perifer dari nosiseptor sensori dan nyeri oleh sel-sel imun (proses fase inflamasi respons nyeri) .....	13
2.2 Kerangka teori penelitian .....	19
2.3 Kerangka konseptual penelitian .....	20
3.1 Skema rancangan penelitian .....	22
3.2 Skema perlakuan terhadap hewan coba .....	32
4.1 Histogram rata-rata <i>licking time</i> .....	35
4.2 Histogram hasil uji <i>Games-Howell licking time</i> fase kedua .....	37

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
3.1 Surat identifikasi tanaman kakao ( <i>Theobroma cacao L.</i> ) .....	48
3.2 Surat persetujuan etik penelitian .....	51
3.3 Perhitungan dosis berdasarkan rata-rata berat badan hewan coba .....	53
3.4 Volume maksimal larutan yang dapat diberikan pada hewan .....	53
3.5 Dokumentasi prosedur penelitian .....	54
4.1 Data <i>licking time</i> fase pertama dan fase kedua .....	56
4.2 Hasil uji normalitas <i>shapiro wilk</i> .....	57
4.3 Hasil uji homogenitas .....	57
4.4 Hasil uji <i>one way ANOVA</i> dan <i>post hoc Games-Howell</i> .....	58

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Analgesik merupakan kelompok obat yang terdiri dari dua jenis, yaitu golongan opioid dan golongan non-opioid. Golongan analgesik non opioid, yaitu *Non Steroidal Anti Inflammatory Drugs* (NSAID) yang paling sering digunakan adalah natrium diklofenak, ibuprofen dan asam mefenamat (Syarif *et al.*, 2012). Departemen Kesehatan (2007) menyatakan bahwa diperkirakan lebih dari 30 juta penduduk di seluruh dunia mengkonsumsi NSAID setiap hari dan akan berpengaruh pada peningkatan risiko terjadi penyakit akibat efek samping obat, misalnya gangguan sistem pencernaan. Penggunaan NSAID jangka panjang dapat menyebabkan efek samping ringan seperti mual dan dispepsia (prevalensi sekitar 50-60%) dan komplikasi yang lebih serius seperti penyakit tukak peptik (3-4%) yang menyebabkan perdarahan atau perforasi pada 1,5% pengguna NSAID per tahun. Pasien yang meninggal akibat komplikasi pada sistem gastrointestinal oleh pemakaian NSAID diperkirakan mencapai sekitar 20.000 setiap tahun (Valle, 2005).

Analgesik merupakan istilah medis yang digunakan untuk suatu bahan yang dapat mengurangi nyeri tanpa menyebabkan hilangnya kesadaran (Dorland, 2012). Nyeri merupakan suatu respons peradangan akibat sensasi perangsangan sistem saraf (Price & Wilson, 2006). Respons tersebut terdiri dari dua fase, yaitu fase lambat atau fase pertama (fase neurogenik) dan fase kedua (fase inflamasi). Substansi P dan bradikinin berperan penting dalam sensitisasi respons nyeri fase neurogenik (Sherwood, 2012). Sensitisasi respons nyeri fase inflamasi dimodulasi oleh mediator proinflamasi yang diproduksi oleh sel imun, seperti IL-5, serotonin, dan histamin yang diproduksi oleh sel mast serta TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , dan IL-6 yang diproduksi oleh sel mast, neutrofil, dan makrofag (Ribeiro *et al.*, 2016).

Kakao merupakan tanaman yang mengandung zat fenolik, yaitu polifenol, katekin, epikatekin, prosianidin polimer, prosianidin B2, dan jenis molekul flavonoid lainnya yang dapat menghambat reaksi imun pro-inflamasi penginduksi nyeri, misalnya polifenol dapat menghambat efek PGE2, TNF- $\alpha$ , IL-6, dan IL-1 $\beta$ ,

epikatekin dapat menghambat TNF- dan IL-6, serta prosianidin B2 dan katekin dapat menurunkan TNF- (Andújar *et al.*, 2011). Senyawa fenolik dalam kulit kakao konsentrasinya lebih tinggi dibandingkan dengan biji kakao. Sebuah penelitian menyatakan bahwa rata-rata fenolik total pada biji dari lima jenis kakao yang berbeda sebesar  $\pm 31,8$  mgGAE/gDW sedangkan pada kulitnya mencapai  $\pm 70$  mgGAE/gDW (Kumari & Abeysinghe, 2011).

Kakao (*Theobroma cacao L.*) merupakan bahan industri yang sering dimanfaatkan sebagai bahan pembuatan cokelat, namun bagian yang dimanfaatkan dari tanaman tersebut adalah biji sehingga bagian kulit kakao menumpuk sebagai limbah (Depperin, 2007), yaitu mencapai 75% dari total produksi (Wahyudi *et al.*, 2008). Limbah tersebut dapat menyebabkan pencemaran udara akibat timbulnya bau busuk yang tidak terkendali yang disebabkan oleh aktivitas mikroba penghasil gas amonia (Indriani, 2004). Bahaya utama yang dapat disebabkan oleh gas amonia terhadap kesehatan manusia adalah luka bakar pada saluran pernafasan, kulit, mata, dan membran mukosa (Badan POM RI, 2012). Indonesia merupakan produsen kakao terbesar ketiga di dunia setelah negara *Pantai Gading* dan *Ghana*. Luas lahan tanaman kakao (*Theobroma cacao L.*) di Indonesia kurang lebih 992.448 Ha dengan produksi biji kakao sekitar 456.000 ton per tahun. Jember merupakan salah satu tempat pusat industri dan pusat penelitian kakao di Indonesia (Depperin, 2007). Kondisi tersebut sangat mendukung adanya kegiatan penelitian tentang pemanfaatan kakao (*Theobroma cacao L.*).

Berdasarkan uraian di atas, peneliti bermaksud untuk menguji efektivitas analgesik ekstrak kulit kakao dilihat dari akumulasi waktu yang dibutuhkan selama respons menjilat (*licking time*) fase pertama dan fase kedua pada bagian kaki mencit yang diinduksi formalin. Peneliti berharap penggunaan ekstrak kulit kakao sebagai analgesik dapat menurunkan morbiditas komplikasi akibat penggunaan NSAID dan mengatasi permasalahan limbah kulit kakao yang dapat membahayakan kesehatan manusia di sekitar kebun kakao.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, rumusan masalah penelitian ini, yaitu bagaimana efektivitas analgesik ekstrak kulit kakao terhadap *licking time* mencit yang diinduksi formalin?

## 1.3 Tujuan

### 1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini, yaitu untuk mengetahui efektivitas analgesik ekstrak kulit kakao.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus penelitian ini, yaitu.

- a. Untuk mengukur perubahan respons nyeri, yaitu *licking time* fase pertama dan fase kedua mencit yang diinduksi formalin.
- a. Untuk mengetahui persentase inhibisi ekstrak kulit kakao terhadap respons nyeri, yaitu *licking time* mencit yang diinduksi formalin.

## 1.4 Manfaat

### 1.4.1 Manfaat bagi Peneliti

Penelitian ini dilakukan untuk menambah wawasan peneliti dalam bidang farmakologi terutama tentang efektivitas analgesik ekstrak kulit kakao.

### 1.4.2 Manfaat bagi Institusi

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat menjadi pendukung tercapainya visi dan misi Fakultas Kedokteran Universitas Jember yaitu mengembangkan sains, teknologi, dan seni yang inovatif, berwawasan lingkungan, bisnis, dan dalam rangka pengembangan bidang agromedis.

#### 1.4.3 Manfaat bagi Ilmu Pengetahuan

Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan sebagai landasan teoritis tentang efektifitas analgesik ekstrak kulit kakao terhadap *licking time* mencit yang diinduksi formalin.



## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Analgesik

Analgesik merupakan istilah medis yang digunakan untuk suatu bahan yang dapat mengurangi nyeri tanpa menyebabkan hilangnya kesadaran (Dorland, 2012). Analgesik merupakan kelompok obat yang terdiri dari dua jenis, yaitu golongan opioid dan golongan non-opioid. Analgesik opioid dahulu seringkali disebut sebagai analgesik narkotik, akan tetapi golongan obat ini dapat menimbulkan efek antinyeri tanpa menyebabkan tidur atau menurunkan kesadaran sehingga istilah analgesik narkotik menjadi kurang tepat. Analgesik non-opioid, yaitu *Non Steroidal Anti Inflammatory Drugs* (NSAID) adalah salah satu golongan obat yang banyak diresepkan dan juga digunakan tanpa resep dokter (Syarif *et al.*, 2012).

#### 2.1.1 Analgesik Opioid

Analgesik opioid merupakan kelompok obat yang memiliki sifat seperti opium. Opium yang berasal dari getah *Papaver somniferum* mengandung sekitar 20 jenis alkaloid diantaranya morfin, kodein, tebain, dan papaverin. Analgesik opioid terutama digunakan untuk meredakan atau menghilangkan rasa nyeri, namun juga menunjukkan adanya efek farmakodinamik yang lain (Syarif *et al.*, 2012). Jenis-jenis obat opioid, yaitu agonis penuh reseptor  $\mu$  (mu), misalnya morfin, agonis parsial reseptor  $\mu$ , misalnya kodein, dan jenis opioid lainnya yang bekerja pada reseptor  $\delta$  (delta) dan  $\kappa$  (kappa). Berikut ini adalah farmakokinetik, farmakodinamik, indikasi, dan efek samping analgesik opioid (Emmanuel *et al.*, 2014).

##### a. Farmakokinetik

Sebagian besar analgesik opioid diserap baik jika diberikan melalui rute subkutis, intramuskulus, dan oral, namun dosis oral opioid (misalnya, morfin) mungkin harus jauh lebih tinggi dibandingkan dosis parenteral untuk menghasilkan efek terapeutik karena adanya efek *first pass*

*metabolism*. Penyerapan opioid oleh berbagai organ dan jaringan adalah suatu fungsi dari berbagai faktor fisiologik dan kimiawi, meskipun semua opioid berikatan dengan protein plasma dengan afinitas beragam, obat-obat ini cepat meninggalkan kompartemen darah dan mengendap paling tinggi di jaringan yang banyak mendapat darah, misalnya otak, paru, hati, ginjal, dan limpa. Setelah diserap, metabolisme opioid umumnya diubah menjadi metabolit-metabolit polar (terutama glukoronida), yang kemudian mudah diekskresikan oleh ginjal. Akumulasi berbagai metabolit ini dapat menimbulkan efek samping pada pasien penderita gagal ginjal atau pada pasien dengan pemberian dosis yang berlebihan (Emmanuel *et al.*, 2014).

b. Farmakodinamik

Agonis opioid menghasilkan analgesia atau efek antinyeri dengan berikatan dengan reseptor spesifik terkait-protein G yang berada di otak dan korda spinalis yang berperan dalam penyaluran dan modulasi nyeri. Beberapa efek analgesik kemungkinan diperantarai oleh reseptor opioid di ujung saraf sensorik perifer (Syarif *et al.*, 2012).

Reseptor opioid terdiri dari tiga golongan utama, yaitu reseptor  $\mu$ ,  $\kappa$ , dan  $\delta$  di berbagai jaringan saraf dan jaringan lain. Reseptor  $\mu$  berfungsi menyebabkan sedasi, menghambat pernapasan, memperlambat transit di saluran cerna serta memodulasi pelepasan hormon dan neurotransmitter. Reseptor  $\kappa$  berfungsi memodulasi pelepasan hormon dan neurotransmitter sedangkan reseptor  $\delta$  berfungsi memperlambat waktu transit di saluran cerna. Ketiga reseptor tersebut merupakan anggota dari famili reseptor terkait-protein G. Reseptor yang terhubung dengan protein G pada neuron mengalami interaksi yang menyebabkan dua efek langsung, yaitu penurunan pelepasan transmitter, misalnya glutamat, asetilkolin, dan substansi P akibat penutupan saluran  $\text{Ca}^{2+}$  di ujung saraf prasinaps serta pembukaan saluran  $\text{K}^{+}$  pascasinaps akibat terjadinya hiperpolarisasi. Kedua efek tersebut menimbulkan penghambatan nyeri (Emmanuel *et al.*, 2014).

Sebagian besar analgesik yang saat ini tersedia bekerja terutama di reseptor  $\mu$  opioid. Analgesia dan efek morfin dalam menimbulkan euforia, depresi pernapasan, dan ketergantungan fisik terutama terjadi karena efek pada reseptor  $\mu$ . Mekanisme terbentuknya toleransi dan ketergantungan fisik masih belum diketahui secara jelas, namun pengaktifan terus menerus reseptor  $\mu$  seperti yang terjadi pada pengobatan nyeri hebat kronik kemungkinan berperan penting dalam induksi ketergantungan (Syarif *et al.*, 2012).

c. Indikasi

Analgesik opioid dapat digunakan untuk mengatasi nyeri hebat, misalnya nyeri yang berkaitan dengan kanker dan penyakit terminal lainnya. Penyakit-penyakit tersebut membutuhkan pemberian analgesik opioid poten secara terus-menerus sehingga dapat meningkatkan resiko ketergantungan. Analgesik opioid juga sering digunakan selama persalinan obstetrik karena opioid dapat menembus sawar plasenta dan mencapai janin. Pemberian analgesik opioid pada persalinan harus hati-hati untuk menghindari depresi neonatus. Nyeri akut dan parah pada kolik ginjal juga membutuhkan pemberian analgesik opioid kuat untuk meredakannya (Emmanuel *et al.*, 2014).

d. Efek Samping

Analgesik opioid dapat menimbulkan efek samping pada sistem saraf pusat, sistem kardiovaskuler dan sistem pencernaan. Efek pada sistem saraf pusat, misalnya depresi pernapasan akibat hambatan mekanisme respirasi batang otak, mual dan muntah akibat aktivasi *chemoreceptor trigger zone* di batang otak, dan hipotermia atau hipertermia akibat gangguan regulasi homeostatik suhu tubuh oleh peptide-peptide opioid endogen di otak (Syarif *et al.*, 2012).

### 2.1.2 Analgesik Non-opioid

Analgesik non-opioid, yaitu *Non Steroidal Anti Inflammatory Drugs* (NSAID) ini merupakan suatu kelompok obat yang heterogen secara kimia. Walaupun demikian, obat-obat ini ternyata memiliki banyak persamaan dalam efek terapi ataupun efek samping. Kemajuan penelitian dalam dasawarsa terakhir ini menyatakan bahwa kelompok heterogen tersebut memiliki kesamaan efek terapi dan efek samping berdasarkan atas penghambatan biosintesis prostaglandin (PG). Berikut ini adalah farmakokinetik, farmakodinamik, indikasi dan efek samping NSAID (Syarif *et al.*, 2012).

#### a. Farmakokinetik

Sebagian besar dari obat ini diserap dengan baik melalui saluran cerna secara cepat dan lengkap. NSAID dimetabolisme di hati. Ekskresi di ginjal adalah rute terpenting eliminasi akhir. Hampir semua obat mengalami ekskresi di empedu dan reabsorpsi (sirkulasi enterohepatik) dengan derajat bervariasi. Derajat iritasi saluran cerna bawah berkorelasi dengan jumlah sirkulasi enterohepatik. Sebagian besar NSAID sangat terikat dengan protein ( $\pm 98\%$ ), misalnya terikat pada albumin (Emmanuel *et al.*, 2014).

Semua obat NSAID dapat ditemukan di cairan sinovium setelah pemberian obat berulang. Obat dengan waktu paruh singkat berada di sendi paling lama daripada yang diperkirakan dari waktu paruh yang sebenarnya, sementara obat dengan waktu paruh lama menghilang dari cairan sinovium dengan laju setara dengan waktu paruh yang sebenarnya (Emmanuel *et al.*, 2014).

#### b. Farmakodinamik

Sebagai analgesik, NSAID hanya efektif terhadap nyeri yang intensitasnya rendah sampai sedang, misalnya sakit kepala, mialgia, artralgia, dan nyeri lain yang berasal dari integumen, terutama terhadap nyeri yang berkaitan dengan inflamasi. Efek analgesiknya jauh lebih lemah daripada efek analgesik opioid. NSAID tidak menimbulkan ketagihan

sehingga tidak menimbulkan efek sentral yang merugikan. NSAID hanya mengubah modalitas sensorik nyeri, tidak mempengaruhi sensorik lain. Kebanyakan NSAID lebih dimanfaatkan sebagai analgesik pada pengobatan kelainan muskuloskeletal, misalnya artritis reumatoid, osteoarthritis dan spondilitis ankilosa, namun NSAID tersebut hanya meringankan gejala nyeri dan inflamasi yang berkaitan dengan penyakitnya secara simptomatik, tidak menghentikan, memperbaiki, atau mencegah kerusakan jaringan pada kelainan muskuloskeletal ini (Syarif *et al.*, 2012).

Klasifikasi NSAID, tidak banyak manfaat kliniknya karena ada NSAID dari subgolongan yang sama memiliki sifat yang berbeda, sebaliknya ada obat NSAID yang berbeda subgolongan tetapi memiliki sifat yang serupa. Klasifikasi yang lebih bermanfaat untuk diterapkan di klinik ialah berdasarkan selektivitasnya terhadap *cyclooxygenase* (Emmanuel *et al.*, 2014).

Golongan analgesik non opioid yang paling sering digunakan adalah asam mefenamat, ibuprofen, dan natrium diklofenak (Syarif *et al.*, 2012). Asam mefenamat, ibuprofen, dan natrium diklofenak tergolong penghambat *cyclooxygenase* (COX) relatif non-selektif. Golongan obat ini menghambat enzim siklooksigenase sehingga konversi asam arakhidonat menjadi PGE<sub>2</sub> terganggu. Enzim siklooksigenase terdapat dalam 2 isoform disebut *cyclooxygenase-1* (COX-1) dan *cyclooxygenase-2* (COX-2). Kedua isoform tersebut dikode oleh gen yang berbeda dan ekspresinya bersifat unik. Secara garis besar COX-1 esensial dalam pemeliharaan berbagai fungsi pada kondisi normal di berbagai jaringan khususnya ginjal, saluran cerna, dan trombosit. Di mukosa lambung, aktivasi COX-1 menghasilkan prostasiklin yang bersifat sitoprotektif. COX-2 semula diduga diinduksi oleh berbagai stimulus inflamatoar, termasuk sitokin, endotoksin dan faktor pertumbuhan (*growth factor*), namun ternyata sekarang COX-2 juga mempunyai fungsi fisiologis, yaitu di ginjal, jaringan vaskuler, dan pada proses perbaikan jaringan. Tromboksen-A<sub>2</sub>, yang disintesis trombosit oleh COX-1, menyebabkan agregasi trombosit, vasokonstriksi dan proliferasi otot polos.

Sebaliknya, prostasiklin ( $\text{PGI}_2$ ) yang disintesis oleh COX-2 di endotel makrovaskuler melawan efek tersebut dan menyebabkan penghambatan agregasi trombosit, vasodilatasi, dan efek anti-proliferatif (Emmanuel *et al.*, 2014).

c. Indikasi

Sebagai analgesik, NSAID hanya efektif terhadap nyeri dengan intensitas rendah sampai sedang, misalnya sakit kepala, mialgia, artralgia dan nyeri lain yang berasal dari integumen, terutama terhadap nyeri yang berkaitan dengan inflamasi (Syarif *et al.*, 2012).

d. Efek Samping

Selain menimbulkan efek terapi yang sama, NSAID juga memiliki efek samping serupa karena berdasarkan oleh hambatan pada sistem biosintesis prostaglandin (PG), selain itu kebanyakan obat bersifat asam sehingga lebih banyak terkumpul dalam sel yang bersifat asam, misalnya di lambung, ginjal, dan jaringan inflamasi. Sifat asam pada obat NSAID menimbulkan efek terapi ataupun efek samping yang tinggi pada lambung, ginjal, dan jaringan inflamasi (Syarif *et al.*, 2012).

Secara umum NSAID berpotensi menyebabkan efek samping pada tiga sistem organ, yaitu saluran cerna, ginjal, dan hati. Efek samping tersebut meningkat pada pasien usia lanjut karena seringkali menderita berbagai penyakit yang membutuhkan terapi NSAID dalam jangka waktu panjang (Emmanuel *et al.*, 2014).

Efek samping pada pencernaan yang paling sering terjadi akibat penggunaan NSAID adalah induksi tukak peptik (tukak duodenum dan tukak lambung) yang kadang-kadang disertai anemia sekunder akibat perdarahan saluran cerna. Beratnya efek samping tersebut berbeda antar obat. Dua mekanisme terjadinya iritasi lambung adalah iritasi yang bersifat lokal yang menimbulkan difusi kembali asam lambung ke mukosa dan menyebabkan kerusakan jaringan serta iritasi atau perdarahan lambung yang

bersifat sistemik melalui hambatan biosintesis prostaglandin PGE<sub>2</sub> dan PGE<sub>1</sub>. Kedua prostaglandin tersebut banyak ditemukan di mukosa lambung dengan fungsi menghambat sekresi asam lambung dan merangsang sekresi mukus usus halus yang bersifat sitoprotektif. Gangguan saluran cerna penghambat selektif COX-2 lebih ringan daripada COX-1. Efek samping lain ialah gangguan fungsi trombosit akibat penghambatan biosintesis tromboksan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) dengan akibat perpanjangan waktu perdarahan (Syarif *et al.*, 2012).

## 2.2 Nyeri

Nyeri merupakan sensasi tidak menyenangkan yang terlokalisasi pada suatu bagian tubuh. Nyeri seringkali dijelaskan dalam istilah proses destruktif jaringan (misalnya seperti ditusuk-tusuk, panas terbakar, melilit, seperti dirobek-robek, seperti diremas-remas) dan/atau suatu reaksi badan atau emosi, seperti perasaan takut, mual, mabuk (Isselbacher *et al.*, 2014). Rasa nyeri merupakan mekanisme perlindungan. Rasa nyeri terjadi bila ada kerusakan jaringan. Hal tersebut menyebabkan individu bereaksi dengan cara memindahkan stimulus nyeri (Guyton & Hall, 2012).

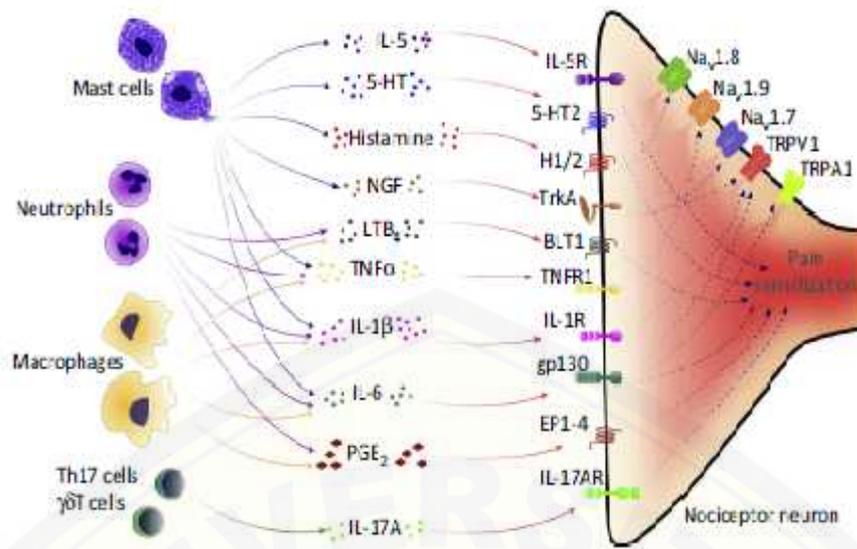
Reseptor nyeri merupakan ujung saraf bebas. Reseptor rasa nyeri yang terdapat di kulit dan jaringan lain semuanya merupakan ujung saraf bebas. Reseptor ini tersebar luas pada permukaan superfisial kulit dan juga di jaringan dalam tertentu, misalnya periosteum, dinding arteri, permukaan sendi, dan *falx cerebri* serta tentorium tempurung kepala. Sebagian besar jaringan dalam lainnya hanya sedikit sekali dipersarafi oleh ujung saraf nyeri (Guyton & Hall, 2012).

Terdapat tiga jenis stimulus yang merangsang reseptor rasa nyeri atau nosiseptor, yaitu mekanis, suhu, dan kimiawi (Guyton & Hall, 2012). Reseptor rasa nyeri atau nosiseptor mekanis berespons terhadap kerusakan mekanis misalnya tersayat, terpukul, atau cubitan, nosiseptor suhu berespons terhadap suhu ekstrim, terutama panas, dan nosiseptor polimodal yang berespons sama kuat terhadap semua jenis rangsangan yang merusak, termasuk bahan kimia iritan yang dikeluarkan oleh jaringan yang cedera (Sherwood, 2012).

Beberapa zat kimia yang merangsang jenis nyeri kimiawi adalah bradikinin, serotonin, histamin, ion kalium, asam, asetilkolin, dan enzim proteolitik. Selain itu, prostaglandin dan substansi P meningkatkan sensitivitas ujung-ujung serabut nyeri. Substansi kimia terutama penting untuk perangsangan lambat yang terjadi setelah cedera jaringan, yaitu respons nyeri fase pertama (fase neurogenik) yang merupakan jenis rasa nyeri yang menusuk (Guyton & Hall, 2012).

Semua nosiseptor dapat ditingkatkan kepekaannya oleh adanya prostaglandin yang berperan penting dalam peningkatan respons reseptor terhadap rangsangan yang mengganggu, yaitu terasa lebih sakit jika ada prostaglandin. Prostaglandin adalah kelompok khusus turunan asam lemak yang berasal dari lapis ganda lemak membran plasma dan bekerja lokal setelah dibebaskan. Cedera jaringan antara lain, dapat menyebabkan pelepasan lokal prostaglandin. Bahan-bahan kimia ini bekerja pada ujung perifer nosiseptor untuk menurunkan ambang pengaktifan reseptor (Sherwood, 2012).

Setelah respons nyeri fase pertama, terjadi respons nyeri fase kedua (fase inflamasi) yang diakibatkan oleh proses inflamasi. Selama proses inflamasi, jaringan yang rusak merekrut sel-sel imun yang memproduksi mediator inflamasi, seperti sitokin, lipid, protease, dan *growth factors*. Mediator tersebut mengaktifkan nosiseptor pada saraf perifer sehingga menimbulkan respons nyeri. Selama degranulasi, sel mast menghasilkan interleukin 5 (IL-5), serotonin (5-HT), histamin, dan *nerve growth factor* (NGF) yang bereaksi pada IL-5R, 5-HT<sub>2</sub>, reseptor histamin 2 (H<sub>2</sub>), dan neuron nosiseptor yang masing-masing menimbulkan respons nyeri. Neuron nosiseptor juga di sensitisasi oleh *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF), IL-1, dan IL-6 yang diproduksi oleh sel mast, makrofag, dan neutrofil. Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) yang dihasilkan oleh makrofag dan sel imun *innate* lainnya juga mengaktifkan neuron nosiseptor melalui reseptor PGE<sub>2</sub>1-4 (Ribeiro *et al.*, 2016). Mekanisme tersebut dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Pelepasan mediator yang memproduksi sensitisasi perifer dari nosiseptor sensori dan nyeri oleh sel-sel imun (proses fase inflamasi respons nyeri)

Impuls nyeri yang berasal dari nosiseptor disalurkan ke sistem saraf pusat (SSP) melalui salah satu dari dua jenis serat aferen. Sinyal yang berasal dari nosiseptor mekanis dan suhu disalurkan melalui serat A-delta halus bermielin dengan kecepatan hingga 30 m/detik, yaitu jalur nyeri cepat. Impuls dari nosiseptor polimodal disalurkan oleh serat C halus tak bermielin dengan kecepatan jauh lebih rendah, yaitu 12 m/detik sehingga disebut jalur nyeri lambat (Guyton & Hall, 2012).

Banyak struktur berperan dalam pemrosesan sensasi nyeri. Serat-serat nyeri aferen primer bersinaps dengan antar neuron ordo kedua spesifik di tanduk dorsal medula spinalis. Sebagai respons terhadap potensial aksi yang dipicu oleh rangsangan, serat-serat nyeri aferen mengeluarkan neurotransmitter yang mempengaruhi neuron-neuron berikutnya. Dua neurotransmitter yang paling banyak diketahui adalah substansi P dan glutamat. Substansi P mengaktifkan jalur-jalur asendens yang menyalurkan sinyal nosiseptif ke tingkat yang lebih tinggi untuk pemrosesan lebih lanjut (Sherwood, 2012).

## 2.3 *Theobroma cacao* L.

### 2.3.1 Klasifikasi Umum

Klasifikasi tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) menurut *United States Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Services* adalah :

Kingdom	: <i>Plantae</i> (tumbuh-tumbuhan)
Subkingdom	: <i>Tracheobionta</i> (tumbuhan vaskular)
Divisi	: <i>Spermatophyta</i> (tumbuhan berbunga)
Subdivisi	: <i>Angiospermae</i>
Klas	: <i>Dicotyledoneae</i> (tumbuhan dikotil)
Subklas	: <i>Dialypetalae</i>
Ordo	: <i>Malvales</i>
Familia	: <i>Sterculiaceae</i>
Genus	: <i>Theobroma</i> L.
Spesies	: <i>Theobroma cacao</i> L.

### 2.3.2 Morfologi Umum

Tanaman kakao merupakan tanaman *evergreen*, yaitu tanaman yang tidak menggugurkan seluruh daunnya secara serentak pada suatu musim atau kondisi lingkungan tertentu. Tanaman kakao memiliki batang yang tegak. Tinggi tanaman di kebun umur 3 tahun berkisar antara 1,8-3 m dan pada umur 12 tahun mencapai 4,5-7 m sedangkan kakao yang tumbuh liar ketinggiannya mencapai 20 m. Warna daun muda adalah kuning, kuning cerah, cokelat, merah kecokelatan, hijau kecokelatan, hijau kemerahan, dan hijau sedangkan warna daun tua adalah hijau dan bergelombang pada permukaan atas serta hijau muda, kasar, dan bergelombang pada permukaan bawah. Daun kakao merupakan daun tunggal. Tanaman kakao mempunyai akar tunggang yang disertai akar serabut. Bunga kakao tergolong bunga sempurna. Buah kakao berupa buah buni dengan daging bijinya sangat lunak. Biji kakao dapat dibagi menjadi tiga bagian pokok, yaitu kotiledon (87,10%), kulit (12%), dan lembaga (0,9%). Biji berbentuk bulat telur agak pipih dengan ukuran 2,5 x 1,5 % (Martono, 2016).

### 2.3.3 Kandungan Kimia dan Aktivitas Kakao dalam Proses Inflamasi

Flavonoid terdapat dalam berbagai jenis buah dan sayuran, terutama teh, anggur, dan kakao. Kakao mengandung flavonoid, yaitu polifenol, epikatekin, katekin, dan dimer dari proasianidin B2 dan B1. Selain itu, kakao juga mengandung polifenol lainnya, yaitu kuersetin, kuersetin 3-O-glukosida kuersetin 3-O-arabinosa, hyperoside (kuersetin 3-O-galaktosida), naringenin, luteolin dan apigenin, namun dalam konsentrasi kecil. Bubuk kakao juga merupakan sumber serat tinggi (26%-40%), protein (15% -20%), karbohidrat (sekitar 15%) dan lipid (10% -24%). Kakao juga mengandung mineral dan vitamin, dapat dilihat pada Tabel 2.1 (Mulato *et al.*, 2006 dan Kumari *et al.*, 2011).

Tabel 2.1 Komposisi kimia keping biji dan kulit biji kakao

Komposisi	Keping biji (%)	Kulit Biji (%)
Air	2,1	3,8
Lemak	54,7	3,4
Abu	2,7	8,1
nitrogen		
• n total	2,2	2,8
• n protein	1,3	2,1
• theobromin	1,4	1,3
• kafein	0,07	0,1
Karbohidrat		
• glukosa	0,1	0,1
• pati	6,1	-
• pektin	4,1	8,0
• serat kasar	2,1	18,6
• selulosa	1,9	13,7
• pentosa	1,2	7,1
• gum	1,8	9,0
Tanin		
• asam asetat	0,1	0,1
• asam sitrat	-	0,7
• asam oksalat	0,3	0,3
<i>Total Phenolic</i>	17,36	81,4

Sumber : Mulato *et al.* (2006) dan Kumari *et al.* (2011)

Sebuah penelitian pada sel kultur menunjukkan bahwa terdapat kandungan kimia dari kakao yang memiliki aktivitas molekuler cukup dominan sebagai antiinflamasi, yaitu flavonol (Khan *et al.*, 2014). Flavonol dapat menghambat

mediator inflamasi, seperti NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , COX-2 dan *lipoygenase* (LOX). Protein-protein mediator inflamasi tersebut berkaitan erat dengan kerusakan endotel dan proliferasi sel. Berdasarkan penelitian sel kultur tersebut, efek spesifik flavonoid pada kakao adalah penghambat aktivitas enzim LOX dalam metabolisme asam arakidonat sehingga dapat menimbulkan efek antiinflamasi dan vasoprotektif (Sies *et al.*, 2005). Aktivitas ekstrak kakao dalam proses inflamasi dapat dilihat pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Aktivitas ekstrak fenolik pada kakao dalam proses inflamasi pada sel kultur

<i>Polyphenol</i>	<i>Concentration</i>	<i>Effects</i>
<i>Cocao polyphenol extract</i>	50 $\mu$ M	Reduce PGE2
	5–80 $\mu$ g/mL	Reduce TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, LPS-induced TNF-secretion, NO
	0,1-10 $\mu$ g/mL	Reduce PMA-induced superoxide production, IL-1, IL-6
	10 $\mu$ g/mL	Reduce TNF- $\alpha$ -induced IL-8, COX-2, iNOS and NF- $\kappa$ B activation
	10–20 $\mu$ g/mL	Reduce TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation and PKB phosphorylation
<i>Procyanidin polymers</i>	10 $\mu$ g/mL	Reduce LPS-induced NF- $\kappa$ B activation, IL-6, IL-1
	50 $\mu$ M	=LPS-induced IL-6, IL-8
	2.5–60 $\mu$ M	Reduce TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation and iNOS
<i>procyanidin B2</i>	10–25 $\mu$ g/mL	Reduce TNF- $\alpha$ -induced IL-8
<i>Epicatechin</i>	1.7–50 $\mu$ M	Reduce NF- $\kappa$ B binding, TNF- $\alpha$ and PMA-induced NF- $\kappa$ B activation (=PB1)
	200–400 $\mu$ M	Reduce MCP1, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, NO
	1–10,000 $\mu$ M	Reduce LPS-induced nitrite and TNF- $\alpha$ production
	1.7–17.2 $\mu$ M	Reduce TNF- $\alpha$ -stimulated NF- $\kappa$ B
	10 $\mu$ M	Reduce NF- $\kappa$ B levels and nuclear translocation
<i>Catechin</i>	5–25 $\mu$ g/mL	Reduce LPS-induced nitrite and TNF- $\alpha$ production

Sumber : Goya L. *et al.* (2016)

Penelitian lain juga menunjukkan bahwa ekstrak fenolik pada kakao menghambat mediator inflamasi, yaitu prostaglandin E2 pada sel caco-2 usus manusia (Crouzet *et al.*, 2009). Fenolik pada kakao secara selektif menurunkan aktivitas NF- $\kappa$ B yang diinduksi oleh TNF- $\alpha$  sebagai mediator inflamasi pemicu

rasa nyeri. Berdasarkan penelitian pada kultur makrofag peritoneal secara *ex vivo* menunjukkan bahwa ekstrak kakao menurunkan aktivitas mediator-mediator yang berperan penting dalam proses nyeri, yaitu IL-6, IL-1, dan TNF- $\alpha$  (Andújar *et al.*, 2011).

#### 2.4 Uji Refleks Menjilat Kaki (*Paw Licking Test*)

*Paw Licking Test* merupakan metode uji efek analgesik dengan induksi formalin. Metode ini lebih valid untuk menguji nyeri klinis dibandingkan sebagian besar tes nosiseptif klasik lainnya, seperti uji refleks geliat, *tail flick test* dan *hot-plate test* yang hanya menunjukkan pengalaman nosiseptif jangka pendek, yaitu adaptasi fasik. Uji refleks geliat merupakan suatu metode yang digunakan pada hewan coba yang diinduksi asam asetat. Sedangkan *hot-plate test* merupakan suatu metode yang digunakan untuk melihat efek *licking and jump time* pada hewan coba yang diletakkan pada *hot plate* dengan suhu 55<sup>o</sup>. Metode *Tail flick test* dilakukan dengan menilai waktu yang dibutuhkan hewan coba untuk menarik ekornya yang diletakkan pada sumber panas. *Paw Licking Test* dapat menilai pengalaman nosiseptif jangka panjang, yaitu adaptasi tonik terhadap jaringan yang rusak pada hewan (Fischer *et al.*, 2013).

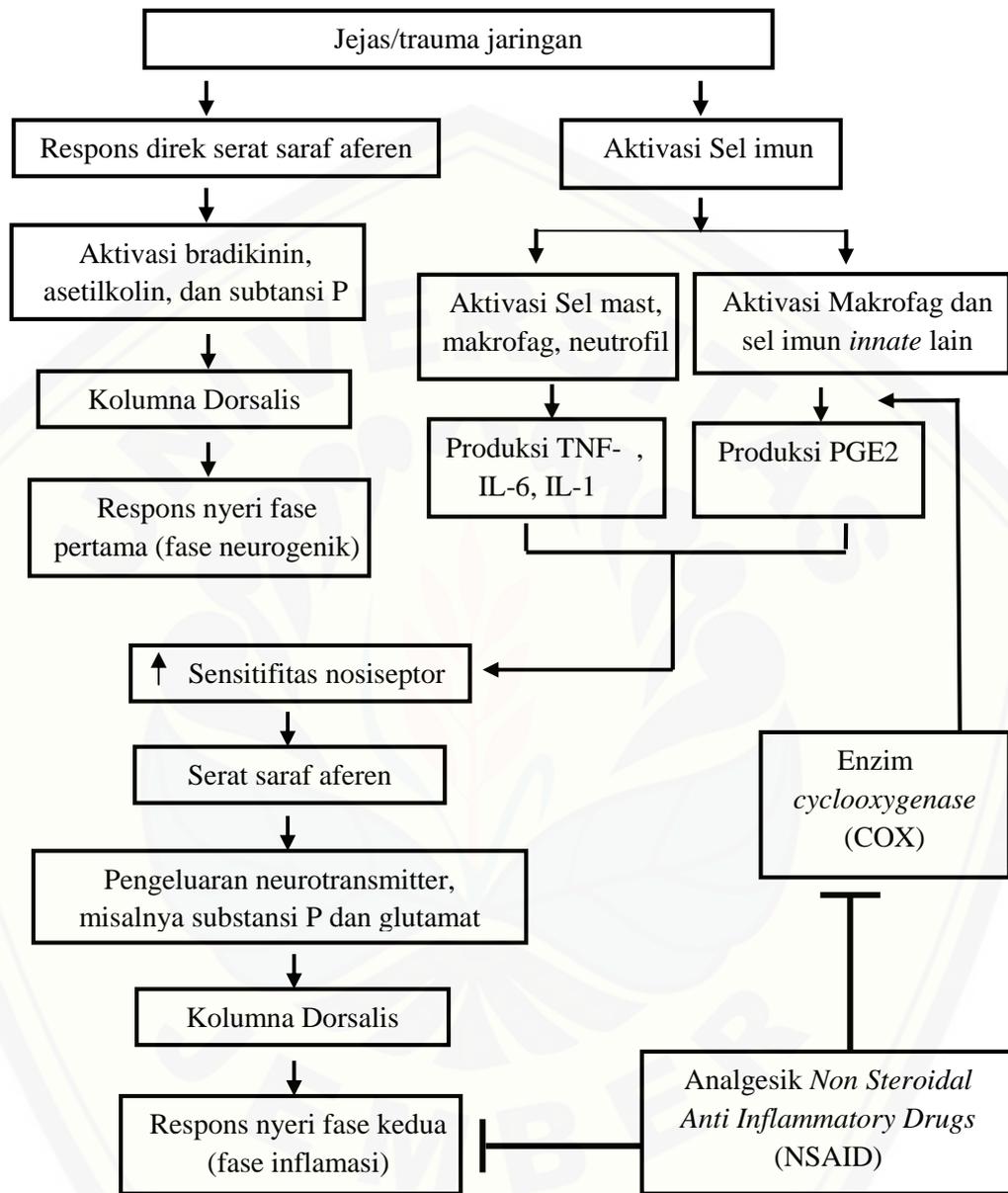
Formalin adalah larutan solusio dengan konsentrasi 37% formaldehida. Injeksi subkutan formalin encer menimbulkan respons perilaku yang mudah dikenali, seperti menjilat atau menggigit kaki yang diinduksi formalin. Respons tersebut bersifat bifasik dengan durasi yang sesuai untuk tes nosiseptif, yaitu sekitar 1 jam (Fischer *et al.*, 2013).

Berbagai penelitian menunjukkan bahwa injeksi formalin yang baik dilakukan pada kaki belakang. Perilaku menjilat pada kaki belakang jarang dilakukan oleh mencit jantan pada kondisi normal, sehingga respons nosiseptif pada kaki belakang lebih spesifik dibandingkan respons pada kaki depan. Beberapa penelitian melakukan injeksi formalin dengan cara yang berbeda-beda, namun cara injeksi yang paling banyak dilakukan adalah secara subkutan (Fischer *et al.*, 2013).

Volume dan konsentrasi formalin yang diaplikasikan dalam berbagai penelitian cukup variatif. Sedangkan konsentrasi yang seringkali digunakan adalah 1-5%. Konsentrasi sebesar 15% digunakan pada penelitian dengan hewan coba berupa tikus. Konsentrasi sebesar 1-5% tersebut merupakan konsentrasi konvensional yang selain memicu efek perilaku menjilat dan menggigit, juga dapat menyebabkan perubahan histologi jangka panjang sebagaimana terlihat secara makroskopis, yaitu perubahan mulai pengelupasan hingga terbentuk scar pada jaringan yang terinduksi formalin. Konsentrasi formalin dibawah 1% memiliki keuntungan jika dibandingkan dengan konsentrasi konvensional. Konsentrasi sebesar 0,25% sesuai untuk induksi respons bifasik, yaitu menjilat dan menggigit. Konsentrasi 0,05-0,2% menginduksi respons fase pertama dengan perubahan histologi yang minimal (Chang *et al.*, 2010).

Pada uji *paw licking test*, hewan coba akan mengalami efek perilaku dalam dua fase respons nosiseptif. Fase pertama terjadi secara langsung setelah injeksi formalin dan berakhir dalam waktu 3-5 menit. 10-15 menit kemudian, hewan coba tidak menunjukkan perilaku nosiseptif. Fase respons nosiseptif yang kedua mulai terjadi kira-kira 15-20 menit setelah injeksi formalin dan berakhir hingga 20-45 menit. Substansi P dan bradikinin berperan penting dalam respons nyeri fase pertama (Shibata *et al.*, 1989). Fase pertama disebut juga dengan fase neurogenik karena nyeri pada fase ini ditimbulkan oleh stimulasi direkt serat saraf sensorik akibat induksi formalin. Sedangkan fase kedua disebut juga fase inflamasi karena nyeri pada fase ini muncul akibat mediator-mediator inflamasi (Chang *et al.*, 2010).

2.5 Kerangka Teori

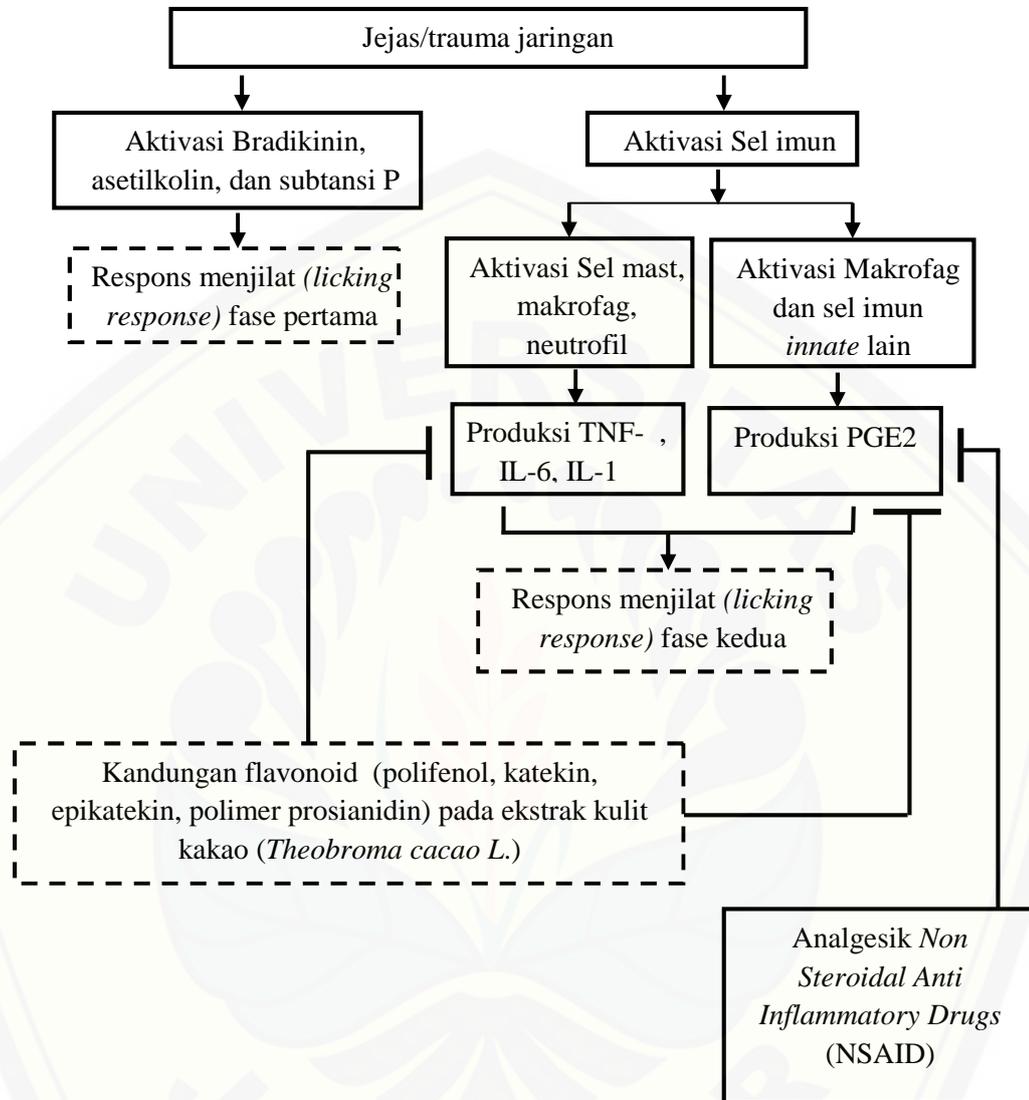


Gambar 2.2 Kerangka teori penelitian

Keterangan

- : Mempengaruhi
- | : Menghambat

2.6 Kerangka Konseptual



Gambar 2.3 Kerangka konseptual penelitian

Keterangan

- : Mempengaruhi
- | : Menghambat
- - - : Variabel yang diteliti

Jejas atau trauma jaringan pada penelitian ini diakibatkan oleh induksi formalin. Jejas tersebut dapat mengaktivasi substansi kimia, seperti bradikinin, asetilkolin, dan substansi P yang berperan penting dalam peningkatan sensitivitas nosiseptor sehingga menimbulkan respons nyeri fase pertama, yaitu fase neurogenik. Respons nyeri fase pertama tersebut ditunjukkan dengan adanya respons menjilat (*licking response*) pada menit ke 1-5 setelah induksi formalin. Jejas tersebut juga dapat mengakibatkan aktivasi sel imun yang dapat memproduksi sitokin proinflamasi penginduksi nyeri, misalnya TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , dan PGE2. Sitokin-sitokin tersebut meningkatkan sensitivitas nosiseptor sehingga menimbulkan respons nyeri fase kedua, yaitu fase inflamasi. Respons nyeri fase kedua tersebut ditunjukkan dengan adanya respons menjilat (*licking response*) pada menit ke 15-45 setelah induksi formalin. Sitokin proinflamasi tersebut dapat dihambat oleh NSAID dan ekstrak kulit kakao (*Theobroma cacao L.*). NSAID menghambat produksi PGE2 sedangkan kandungan flavonoid pada ekstrak kulit kakao menghambat TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , dan PGE2.

## 2.7 Hipotesis

Hipotesis penelitian ini adalah ekstrak kulit kakao efektif menurunkan *licking time* mencit yang diinduksi formalin.

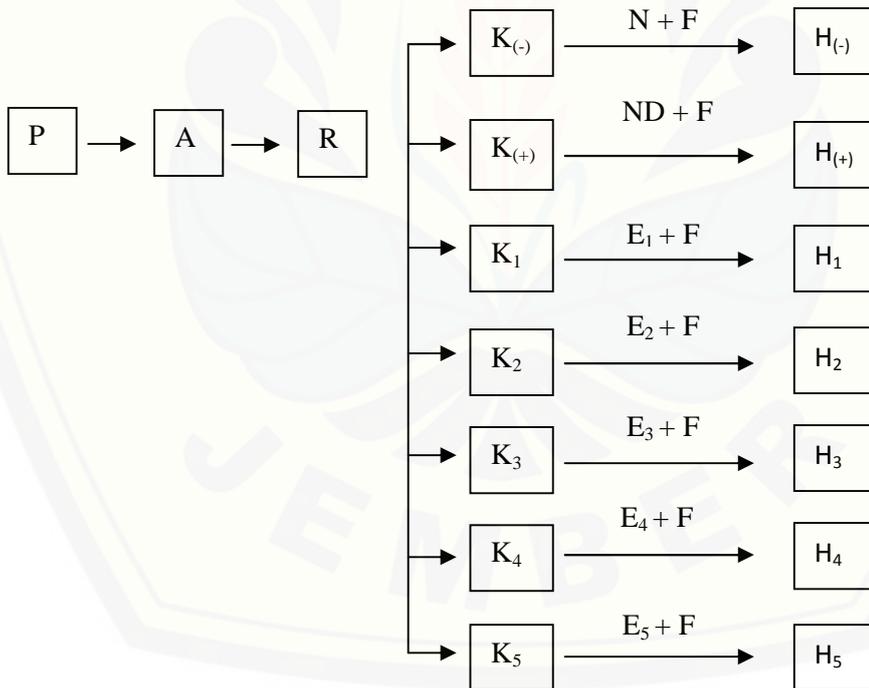
### BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1 Jenis Penelitian

Penelitian tentang efektivitas ekstrak kakao sebagai analgesik ini merupakan jenis penelitian eksperimental murni rancangan acak lengkap pola satu arah dengan *post test only control group design*.

#### 3.2 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah *quasi experimental* dengan rancangan *posttest only control group* yaitu penelitian menggunakan metode sampling secara random dan pengambilan data variabel hanya dilakukan setelah perlakuan. Secara skematis rancangan penelitian ini dapat dilihat dalam Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian

#### Keterangan

- P : Populasi  
 A : Adaptasi mencit

R	: Randomisasi
Kelompok K <sub>(-)</sub>	: Kelompok kontrol negatif
Kelompok K <sub>(+)</sub>	: Kelompok kontrol positif
Kelompok K <sub>1</sub>	: Kelompok perlakuan 1
Kelompok K <sub>2</sub>	: Kelompok perlakuan 2
Kelompok K <sub>3</sub>	: Kelompok perlakuan 3
Kelompok K <sub>4</sub>	: Kelompok perlakuan 4
Kelompok K <sub>5</sub>	: Kelompok perlakuan 5
N	: <i>Sodium Carboxymethyl Cellulose</i> (NaCMC) 1 %
ND	: Natrium diklofenak
E	: Ekstrak kulit kakao
F	: Formalin
H	: <i>Licking time</i> mencit

### 3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi pada penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*). Terdapat kriteria inklusi dan eksklusi yang bertujuan untuk mengurangi bias pada hasil penelitian. Kriteria inklusi adalah karakteristik umum subjek penelitian dari suatu populasi target yang terjangkau yang akan diteliti (Nursalam, 2013). Kriteria inklusi pada penelitian ini meliputi :

1. mencit berkelamin jantan,
2. mencit dalam keadaan sehat (bergerak aktif),
3. usia 2-3 bulan dan berat 20-30 gram

sedangkan kriteria eksklusi adalah upaya mengeluarkan subjek yang memenuhi kriteria inklusi dari penelitian karena sebab-sebab tertentu (Nursalam, 2013). Kriteria eksklusi pada penelitian ini meliputi :

1. mencit yang pernah digunakan penelitian,
2. mencit yang mengalami infeksi sebelum perlakuan,
3. mencit yang mati sebelum proses randomisasi.

Sampel yang digunakan pada penelitian ini diambil dengan teknik random sederhana (*simple random sampling*) dari populasi mencit yang kemudian akan

dibagi menjadi 7 kelompok. Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini ditentukan berdasarkan rumus Federer, yaitu:

$$\begin{aligned}(t-1)(r-1) &= 15 \\ (t-1)(r-1) &= 15 \\ (7-1)(r-1) &= 15 \\ 6(r-1) &= 15 \\ r &= 4\end{aligned}$$

Pada rumus tersebut,  $t$  adalah jumlah perlakuan dan  $r$  adalah banyaknya replikasi setiap kelompok perlakuan, jadi sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 4 ekor mencit untuk 7 kelompok sehingga jumlah sampel yang digunakan adalah 28 ekor mencit.

### 3.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di tiga tempat, yaitu di Laboratorium Fisiologi dan Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember untuk pemeliharaan mencit dan perlakuan terhadap hewan coba, Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Jember untuk pembuatan ekstrak kulit kakao, dan Laboratorium Agronomi Fakultas Pertanian Universitas Jember untuk identifikasi/determinasi tanaman. Waktu pelaksanaan adalah bulan September sampai Oktober 2017. Surat identifikasi tanaman kakao (*Theobroma cacao L.*) dapat dilihat pada Lampiran 3.1.

### 3.5 Variabel Penelitian

#### 3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas merupakan variabel yang mempengaruhi variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak kulit kakao (*Theobroma cacao L.*).

#### 3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah daya analgesik dari ekstrak kulit kakao untuk mengurangi rasa nyeri yang dilihat melalui *licking time* pada

mencit yang diinduksi formalin.

### 3.5.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah :

- a. Hewan uji : mencit albino
- b. Jenis kelamin : jantan
- c. Berat badan : 20-30 gram
- d. Umur : 2-3 bulan
- e. Kondisi hewan uji : sehat

## 3.6 Definisi Operasional

### 3.6.1 Ekstrak Kulit Kakao (*Theobroma cacao L.*)

Bagian tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit karena mengandung senyawa fenolik yang lebih tinggi dibandingkan dengan bagian biji. Kulit kakao didapatkan dari PT. Perkebunan Nasional XII (PERSERO) Kebun Banjarsari, Kabupaten Jember. Ekstrak kulit kakao adalah bahan hasil ekstraksi kulit kakao dengan pelarut aseton dan aquades. Dalam penelitian ini, dosis ekstrak kulit kakao yang diberikan untuk 5 kelompok perlakuan adalah 0,25 mg/gBB, 0,5 mg/gBB, 1 mg/gBB, 2 mg/gBB, dan 4 mg/gBB. Ekstrak tersebut dilarutkan dalam NaCMC 1%. Lalu larutan ekstrak kulit kakao diberikan secara peroral kepada mencit sebelum injeksi 200 µl formalin 2,5 % (Hasani *et al.*, 2011).

### 3.6.2 Natrium Diklofenak

Natrium diklofenak merupakan salah satu obat NSAID yang sering digunakan. Natrium diklofenak yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari apotek yang berada di Kabupaten Jember, yaitu natrium diklofenak bentuk sediaan tablet 50 mg. Dosis natrium diklofenak sebesar 0,0048 mg/gBB yang dicampur dengan NaCMC 1 % diberikan secara peroral.

### 3.6.3 NaCMC

*Sodium Carboxymethyl Cellulose* (NaCMC) merupakan serbuk yang bersifat higroskopis, berwarna putih sedikit kekuningan, tidak berbau, dan tidak berasa. NaCMC banyak digunakan pada formulasi farmasi sediaan oral ataupun topikal karena sifat bahan ini yang dapat meningkatkan kekentalan (*viscosity increasing properties*). NaCMC biasa digunakan pada emulsi dengan kadar 0,25 sampai 1 % (Rowe, 2009). Dalam penelitian ini NaCMC 1% didapatkan dengan melarutkan 1 gram CMC dalam 100 ml air hangat.

### 3.6.4 Formalin

Formalin adalah zat kimia dari tumbuhan subplantar yang dapat menginduksi rangsangan nosiseptor akibat reaksi inflamasi pada mencit. Dosis formalin sebesar 200  $\mu$ L dengan konsentrasi 2,5 % dalam larutan. Larutan formalin tersebut diinjeksikan secara subkutan pada permukaan kaki belakang (Fischer *et al.*, 2013).

### 3.6.5 Licking time

*Licking time* merupakan parameter yang diamati dalam *formalin test*, yaitu akumulasi waktu yang dibutuhkan selama munculnya respons nyeri pada mencit. Respons nyeri berupa refleks menjilat pada permukaan kaki belakang bagian kanan yang diinjeksi oleh formalin. Pada *formalin test*, *Licking time* diamati sebanyak dua kali, yaitu fase pertama (fase rangsangan langsung pada nosiseptor) pada 0-5 menit pertama dan fase kedua (fase munculnya nyeri inflamasi akibat produksi mediator pro-inflamasi) pada 15-45 menit berikutnya (Fischer *et al.*, 2013). Hasil pengamatan *licking time* disajikan dalam bentuk satuan detik (Jakaria *et al.*, 2015)

### 3.6.6 Persentase Inhibisi

Persentase inhibisi adalah perbandingan antara selisih dari absorbansi blanko dan absorbansi sampel dengan absorbansi blanko. Persentase inhibisi

digunakan untuk menentukan persentase hambatan dari suatu bahan yang dilakukan terhadap senyawa radikal bebas.

### 3.7 Alat dan Bahan Penelitian

#### 3.7.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah.

- a. Alat untuk adaptasi dan pemeliharaan mencit adalah neraca elektrik, bak plastik, penutup kawat, tempat makan, botol minum, dan label.
- b. Alat untuk pembuatan ekstrak kakao adalah *blender*, ayakan, timbangan, maserator, *waterbath* dan pengaduk/vortex, *centrifuge*.
- c. Alat untuk pemberian natrium diklofenak dan ekstrak kakao adalah *beaker glass*, pengaduk, spuit sonde, dan handscoon.
- d. Alat untuk injeksi formalin adalah *beaker glass*, spuit dan handscoon.

#### 3.7.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah.

- a. Bahan untuk pemeliharaan mencit adalah makanan pellet, air, dan sekam.
- b. Bahan untuk ekstrak kakao adalah kulit kakao, aquades dan aseton.
- c. Bahan untuk perlakuan adalah formalin 2,5%, natrium diklofenak, larutan ekstrak kakao, aquades dan NaCMC 1 %.

### 3.8 Prosedur Penelitian

#### 3.8.1 Uji Kelayakan Etik

Penelitian ini dilaksanakan setelah mendapatkan keterangan persetujuan etik dengan nomor 1.173/H25.1.11/KE/2017 yang dapat dilihat pada Lampiran 3.2. Prosedur ini bertujuan untuk menguji kesesuaian penelitian dengan etika penelitian kesehatan secara umum yang tercantum dalam *Worlds Medical Association*, yaitu *respect* (menghormati hak dan martabat makhluk hidup, termasuk di dalamnya hewan coba), *beneficiary* (bermanfaat bagi manusia dan makhluk lain, manfaat yang didapatkan harus lebih besar dibandingkan dengan

risiko yang diterima), dan *justice* (bersifat adil dalam memanfaatkan hewan percobaan). Uji kelayakan etik juga bertujuan untuk mengoreksi kesesuaian penelitian dengan prinsip 3 R dalam protokol penelitian pada hewan coba, yaitu *replacement* (keperluan pemanfaatan hewan percobaan telah diperhitungkan secara seksama sehingga tidak dapat digantikan oleh makhluk hidup lain, seperti sel atau biakan jaringan), *reduction* (pemanfaatan hewan dalam penelitian seminimal mungkin, namun tetap mendapatkan hasil yang optimal), *refinement* (memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi, memelihara dengan baik, dan meminimalisir perlakuan menyakitkan) (Ridwan E, 2013).

### 3.8.2 Adaptasi Hewan Coba

Sebelum penelitian dimulai, mencit diadaptasikan terlebih dahulu selama 7 hari di Laboratorium Fisiologi dan Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember untuk menyesuaikan dengan lingkungan baru. Makanan pelet dan minuman diberikan pada semua kandang.

### 3.8.3 Pemilihan Hewan Coba

Jumlah hewan coba adalah 28 ekor mencit (*Mus musculus*) dibagi menjadi 7 kelompok secara randomisasi dengan kriteria *Mus musculus* jantan, mencit sehat (bergerak aktif) dan usia 2-3 bulan dengan berat badan antara 20-30 gram.

### 3.8.4 Pembagian Kelompok Perlakuan

Jumlah kelompok pada penelitian ini adalah 7 kelompok dengan masing-masing kelompok terdiri dari 4 mencit. Pembagian kelompok dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Pembagian kelompok perlakuan

Nama Kelompok	Keterangan
Kelompok K <sub>(-)</sub> :	Diberikan NaCl 1 % peroral 30 menit sebelum injeksi subkutan 200 $\mu$ L formalin dengan konsentrasi 2,5 % dalam larutan
Kelompok K <sub>(+)</sub> :	Diberikan 0,00448 mg/gBB natrium diklofenak peroral 30 menit sebelum injeksi subkutan 200 $\mu$ L formalin dengan konsentrasi 2,5 % dalam larutan
Kelompok P <sub>1</sub> :	Diberikan 0,25 mg/gBB larutan ekstrak kulit kakao peroral 30 menit sebelum injeksi subkutan 200 $\mu$ L formalin dengan konsentrasi 2,5 % dalam larutan
Kelompok P <sub>2</sub> :	Diberikan 0,5 mg/gBB larutan ekstrak kulit kakao peroral 30 menit sebelum injeksi subkutan 200 $\mu$ L formalin dengan konsentrasi 2,5 % dalam larutan
Kelompok P <sub>3</sub> :	Diberikan 1 mg/gBB larutan ekstrak kulit kakao peroral 30 menit sebelum injeksi subkutan 200 $\mu$ L formalin dengan konsentrasi 2,5 % dalam larutan
Kelompok P <sub>4</sub> :	Diberikan 2 mg/gBB larutan ekstrak kulit kakao peroral 30 menit sebelum injeksi subkutan 200 $\mu$ L formalin dengan konsentrasi 2,5 % dalam larutan
Kelompok P <sub>5</sub> :	Diberikan 4 mg/gBB larutan ekstrak kulit kakao peroral 30 menit sebelum injeksi subkutan 200 $\mu$ L formalin dengan konsentrasi 2,5 % dalam larutan

### 3.8.5 Pembuatan Ekstrak Kulit Kakao (*Theobroma cacao L.*)

Sebelum diproses menjadi ekstrak, tanaman kakao yang didapatkan dari PT. Perkebunan Nasional XII (PERSERO) Kebun Banjarsari dideterminasi oleh Laboratorium Agronomi Fakultas Pertanian Universitas Jember terlebih dahulu. Pembuatan ekstrak kulit kakao dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran UNEJ.

Kulit kakao sebanyak 1,5 kg dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran. Setelah itu, kakao dibagi menjadi dua bagian lalu biji dipisahkan dari kulitnya. Kulit kakao dipotong tipis-tipis lalu dikeringkan menggunakan inkubator 60<sup>0</sup>C, setelah kering kulit tersebut dihaluskan menggunakan blender sampai menjadi serbuk lalu diayak menggunakan ayakan sehingga didapatkan serbuk halus. Serbuk halus kulit kakao diekstraksi menggunakan aseton/aquades 50/50 v/v. Volume pelarut yang digunakan untuk maserasi setiap 0,5 g serbuk halus kulit kakao kering, yaitu 5 ml aseton/aquades 50/50 v/v. Maserat disaring menggunakan kertas buchner dan disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Filtrat diletakkan di *waterbath*

dengan suhu 60°C hingga terbentuk ekstrak kental kemudian ekstrak kental yang didapatkan disimpan pada suhu -20°C (Kim *et al.*, 2003).

Dosis ekstrak biji kakao yang dapat menghambat proses inflamasi pada mencit adalah 0,5 mg/gBB (Andujar *et al.*, 2011). Oleh karena itu, variasi dosis ekstrak kulit kakao yang diberikan pada penelitian ini, yaitu 0,25 mg/gBB, 0,5 mg/gBB, 1 mg/gBB, 2 mg/gBB, dan 4 mg/gBB yang dilarutkan ke dalam NaCMC 1%.

#### 3.8.6 Perlakuan pada Kelompok Sampel

Antinosisseptif pada tes formalin menggunakan natrium diklofenak yang dilarutkan dalam NaCMC 1 % dengan dosis 0,00448 mg/gBB untuk kontrol positif dan diberikan secara peroral 30 menit sebelum injeksi formalin. NaCMC 1 % juga digunakan dalam induksi kelompok kontrol negatif. Pemberian 5 variasi dosis ekstrak kulit kakao melalui sonde lambung dilakukan pada kelompok K1, K2, K3, K4, dan K5. Perhitungan dosis berdasarkan rata-rata berat badan hewan coba dapat dilihat pada Lampiran 3.3 sedangkan volume maksimal penyondean yang dapat diberikan pada hewan coba dapat dilihat pada Lampiran 3.4. Perlakuan pada kelompok sampel tersebut dilakukan setelah adaptasi selama 7 hari. Ekstrak kulit kakao pada lima kelompok perlakuan diberikan secara peroral 30 menit sebelum injeksi formalin.

#### 3.8.7 Penginduksian Formalin

Pada penelitian yang dilakukan oleh Jakaria, *et al.* (2015), induksi 200 µl formalin pada formalin test diberikan dengan konsentrasi 2,5 % dalam larutan aquades. Induksi formalin dilakukan melalui injeksi subkutan pada bagian kaki belakang.

#### 3.8.8 Pemeriksaan *Licking Time*

Pemeriksaan *licking time* dilakukan dengan mengamati akumulasi waktu yang dibutuhkan selama terjadi respons menjilat bagian kaki mencit yang diinduksi formalin. Respons dilihat pada fase pertama, fase respons rangsangan

direk pada nosiseptor, yaitu 1-5 menit pertama. Setelah itu, diamati pada fase kedua, fase nyeri inflamasi akibat produksi mediator pro-inflamasi, yaitu 15-45 menit berikutnya (Fischer *et al.*, 2013). Dokumentasi prosedur penelitian dapat dilihat pada Lampiran 3.5.

### 3.8.9 Perhitungan Persentase Daya Inhibisi

Perhitungan persentase daya inhibisi dilakukan sesuai penelitian Jakaria *et al.*, dengan rumus:

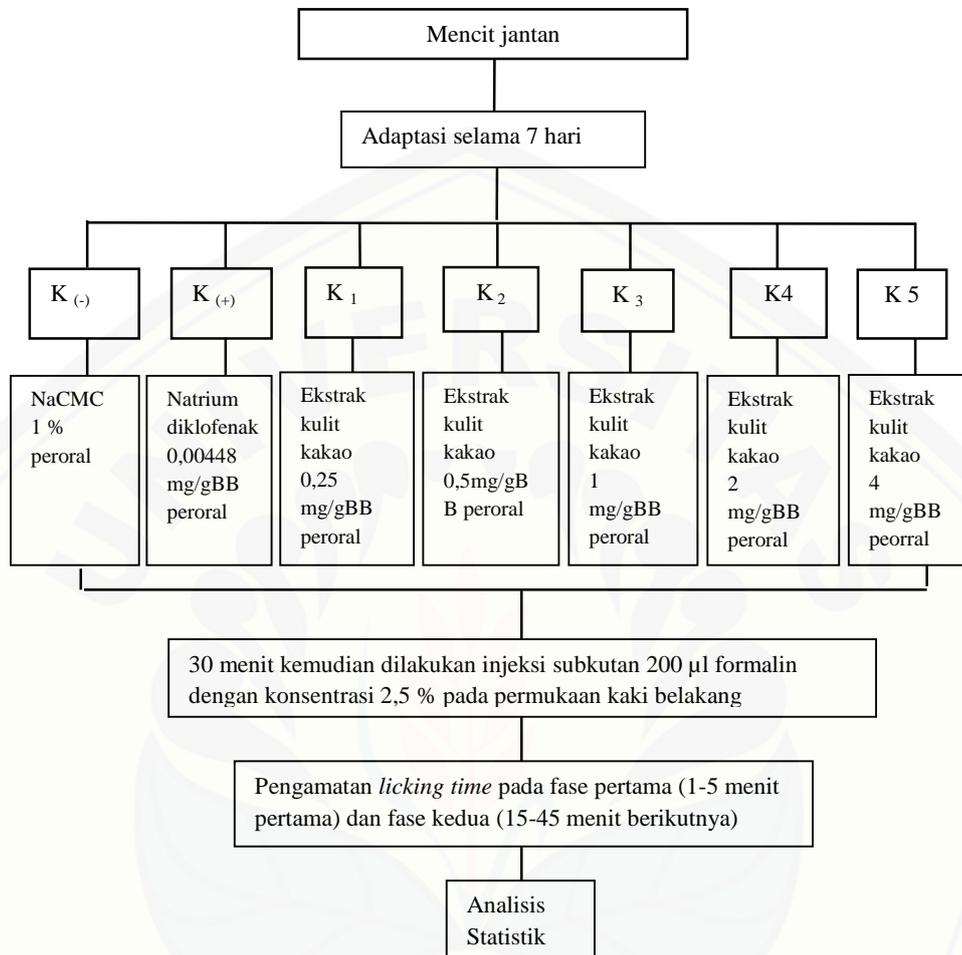
$$\% \text{ inhibisi} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A merupakan *licking time* pada kelompok kontrol negatif sedangkan B adalah *licking time* pada kelompok perlakuan.

### 3.9 Analisis Data

Seluruh data dianalisis secara komputerisasi menggunakan *software* SPSS 23.0. Sebelum dilakukan uji statistik, dilakukan uji normalitas data dengan menggunakan uji *Shapiro Wilk* karena jumlah sampel <50. Hasil uji *Shapiro Wilk* yang didapatkan data terdistribusi normal. Setelah uji normalitas, dilakukan uji homogenitas kemudian dilakukan uji *One Way Annova* ( $p < 0.05$ ). Setelah dilakukan uji signifikansi dan didapatkan hasil yang signifikan ( $p < 0,05$ ), dilakukan analisis *Post Hoc* untuk mengetahui kelompok yang mempunyai perbedaan signifikan. Uji *Post Hoc* yang digunakan adalah uji *Games-Howell* karena varians data tidak homogen.

### 3.10 Alur Penelitian



Gambar 3.2 Skema perlakuan terhadap hewan coba

## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Kesimpulan penelitian ini, yaitu.

- a. Ekstrak kulit kakao (*Theobroma cacao L.*) dapat menurunkan *licking time* fase kedua mencit yang diinduksi formalin secara signifikan, namun tidak menurunkan *licking time* fase pertama secara signifikan.
- b. Pada dosis tertentu, ekstrak kulit kakao (*Theobroma cacao L.*) dapat menghambat respons nyeri, yaitu *licking time* fase pertama dan fase kedua pada mencit yang diinduksi formalin dengan persentase inhibisi yang lebih besar daripada natrium diklofenak.

### 5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan oleh peneliti dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai bahan aktif yang terkandung dalam ekstrak kulit kakao (*Theobroma cacao L.*) sebagai analgesik.
2. Perlu adanya penelitian lebih lanjut terkait efektivitas ekstrak kulit kakao (*Theobroma cacao L.*) sebagai analgesik, khususnya terhadap *licking time* fase pertama mencit yang diinduksi formalin dengan morfin sebagai kontrol positif.
3. Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai efektivitas ekstrak kulit kakao (*Theobroma cacao L.*) yang dikombinasikan dengan natrium diklofenak.

## DAFTAR PUSTAKA

- Andújar, M. I., M. C. Recio, R. M. Giner, E. Cienfuegos-Jovellanos, S. Laghi, B. Muguerza, dan J. L. Ríos. 2011. Inhibition of ulcerative colitis in mice after oral administration of a polyphenol-enriched cocoa extract is mediated by the inhibition of STAT1 and STAT3 phosphorylation in colon cells. *J. Agric. Food Chem.* 59: 6474–6483.
- Arzi, A., B. Ghorbanzadeh, dan Z. N. Khorasgani. 2012. Antinociceptive effect of hydroalcoholic extract of Iranian Green tea in the formalin test in rats. *Jundishapur Journal of Natural.* 8(1): 10-14.
- Badan POM RI. 2012. *Sentra Informasi Keracunan Nasional*. Jakarta: SIKerNas BPOM RI.
- Chang, H. Y., M. J. Sheu, C. H. Yang, T. C. Lu, Y. S. Chang, W. H. Peng, S. S. Huang, dan G. J. Huang. 2009. Analgesic effects and the mechanisms of anti-inflammation of hispolon in mice. *Hindawi Publishing Corporation*. 2010: 1-8.
- Crouzet, B. R., J. V. D. Walle, A. During, A. Joly, C. Rousseau, O. Henry, Y. Larondelle, dan Y. J. Schneider. 2009. Inhibition of inflammatory mediators by polyphenolic plant extracts in human intestinal caco-2 cells. *Food and Chemical Toxicology.* 47: 1221-1230.
- Dahlan, S. 2014. *Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan*. Jakarta: Epidemiologi Indonesia.
- Departemen Perindustrian. 2007. *Gambaran Sekilas Industri Kakao*. Jakarta Selatan: DEPPERIN Jakarta.
- DeRuiter, J. 2002. Principles of drug action. 2<sup>nd</sup> ed. *Fall*. 1-25.
- Dorland, W. A. N. 2012. *Dorland's pocket Medical Dictionary*. Twenty Eighth Edition. Michigan: Elsevier. Terjemahan oleh A. A. Mahode. 2012. *Kamus Saku Kedokteran Dorland*. Jakarta: EGC.
- Emmanuel, T. A., M. J. Aminoff, A. I. Basbaum, N. L. Benowitz, I. Biaggioni, D. D. Bikle, H. A. Boushey, A. D. Briggs, L. Campbell, G. P. Chrousos, E. Chu, R. L. Corelli, M. A. Correia, C. Debattista, D. H. Deck, C. E. Dennehy, B. J. Dong, K. Drasner, H. Eilers, G. A. Fitzgerald, D. E. Furst, A. O. Grant, F. S. Greenspan, N. H. G. Holford, J. R. Horn, J. R. Hume, H. E. Ives, S. R. Jaffrey, J. P. Kane, B. G. Katzung, G. Koren, M. J. Kosnett, M. K. Hall, D. F. Lake, H. W. Lampiris, P. W. Lofholm, C. Luscher, D. S. Maddix, H. I. Maibach, M. J. Malloy, S. B. Masters, K. R. McQuaid, B. S.

- Meldrum, H. Meltzer, R. A. Nicoll, M. S. N. Kennedy, K. R. Olson, A. J. Pappano, R. J. Porter, S. Prakash, I. A. Reid, D. Robertson, D. B. Robertson, P. J. Rosenthal, S. M. Rosenthal, S. Safrin, A. C. Sartorelli, M. A. Schumacher, D. Sheppard, E. M. Smyth, D. T. Teitelbaum, A. J. Trevor, C. Tsourounis, R. W. Ulrich, M. V. Zastrow, W. L. Way, L. G. Winston, S. Yost, dan J. L. Zehnder. 2014. *Basic & Clinical Pharmacology*. Twelveth Edition. Singapore: McGraw-Hill. Terjemahan oleh B. U. Pendi. 2014. *Farmakologi Dasar dan Klinik*. Jakarta: EGC.
- Fischer, M. J. M., G. Carli, P. Raboisson, P. Reeh. 2013. The interphase of the formalin test. *Research Gate*.
- Goya, L., M. A. Martin, B. Sarria, S. Ramos, R. Mateos, dan L. Bravo. 2016. Effect of cocoa and its flavonoids on biomarkers of inflammation: studies of cell culture, animals and humans. *Food and Chemical Toxicology*. 47: 1221-1230.
- Guyton, A. C. dan J. E. Hall. 2012. *Textbook of Medical Physiology*. Eleventh Edition. Michigan: Elsevier. Terjemahan oleh Irawati, D. Ramadhani, F. Indriyani, F. Dany, I. Nuryanto, S. S. P. Rianti, T. Resmisari, dan Y. J. Suyono. 2012. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Jakarta: EGC.
- Hasani, A. S., M. Soljakova, M. H. Jakupi, dan S. Z. Ustalar-Ozgen. 2011. Preemptive analgesic effect of diclofenac: Experimental study in rats. *M.E.J. Anesth*. 21(3): 355-359.
- Hassani, F. V., R. Rezaee, H. Sazegara, M. Hashemzaei, K. Shirani, dan G. Karimi. 2015. Effects of silymarin on neuropathic pain and formalin induced nociception in mice. *Iranian Journal of Basic Medical Science*. 18: 715-720.
- Indriani. 2004. *Membuat Kompos Secara Kilat*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Isselbacher, K. J., E. Braunwald, J. D. Wilson, J. B. Martin, A. S. Fauci, dan D. L. Kasper. 2014. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. Thirteenth Edition. Singapore: McGraw-Hill. Terjemahan oleh A. Hartono. 2014. *Harrison Prinsip-prinsip Ilmu Penyakit Dalam*. Jakarta: EGC.
- Jakaria, M. Parves, R. Zaman, Arifujjaman, I. Hasan, M. A. Sayeed, dan H. Ali. 2015. Investigations of analgesic activity of the methanol extract of *haldina cordifolia* (Roxb.) bark by using *in vivo* animal model studies. *Research Journal of Botany*. 10(3): 98-103.
- Khan, N., O. Khymentets, M. U. Sarda, S. Tulipani, M. G. Aloy, M. Monagas, X. M. Cubillos, R. Llorach, dan C. A. Lacueva. 2014. Cocoa polyphenols and inflammatory markers of cardiovascular disease. *Nutrients*. 6: 844-880.

- Kim, K. H., K.W. Lee, D.Y. Kim, H.H. Park, I.B. Kwon, dan H. J. Lee. 2003. Extraction and fractionation of glucosyltransferase inhibitors from cacao bean husk. *Elsevier*. 39 (2004) 2043-2046.
- Kumari, I. P. N. P. dan D. C. Abeysinghe. 2011. Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Beans, Bean Husks, and Pod husks of Cacao (*Theobroma cacao L.*). *Proceedings of 11th Agricultural Research Symposium*. 362-366.
- Lopes, L. S., R.B. Marques, S.S. Pereira, M.C.C. Ayres, M.H. Chaves, A.J. Cavalheiro, G.M.V. Junior, dan F.R.C. Almeida. 2010. Antinociceptive effect on mice of the hydroalcoholic fraction and (-)epicatechin obtained from *Combretum leprosum* Mart & Eich. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 43(12): 1184-1192.
- Martono, B. 2016. Karakteristik morfologi dan kegiatan plasma nutfah tanaman kakao. *Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar*. 15-27.
- Mulato, S., S. Widyotomo, dan Handaka. 2006. Disain teknologi pengolahan pasta, lemak, dan bubuk cokelat untuk kelompok tani. *Puslit Kopi dan Kakao Indonesia*.
- Nursalam. 2013. *Konsep Penerapan Metode Penelitian*. Jakarta: Salemba Medika.
- Price, S. A. dan L. M. Wilson. 2006. *Pathophysiology: Clinical Concepts of Disease Processes*. Sixth Edition. Michigan: Elsevier. Terjemahan oleh B. U. Pendit, H. Hartanto, P. Wulansari, dan D. A. Mahanani. 2006. *Patofisiologi: Konsep Klinis Proses-proses Penyakit*. Jakarta: EGC.
- Ribeiro, F. A. P., W. A. Verri, dan I. M. Chiu. 2016. Nociceptor sensory neuron-immune interactions in pain and inflammation. *Trends in Immunology*. 1-6.
- Ridwan E. 2013. Etika pemanfaatan hewan percobaan dalam penelitian kesehatan. *J Indon Med Assoc*. 63(3): 112-116.
- Rowe, R. C., P. J. Sheskey, S. C. Owen. 2009. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 6<sup>th</sup> ed. London: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association.
- Santosa B. P. dan Ashari. 2005. *Analisis Statistik dengan Microsoft Excel & SPSS*. Yogyakarta: Andi Offset.
- Shibata, M., T. Ohkubo, H. Takahashi, dan R. Inoki. 1989. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain*. 38(3): 347-352.

- Sherwood, L. 2012. *Human Physiology: From Cells to Systems*. Sixth Edition. Singapore: Cengage Learning Asia Pte Ltd. Terjemahan oleh B. U. Pendit. 2012. *Fisiologi Manusia: dari Sel ke Sistem*. Jakarta: EGC.
- Sies, H., T. Schewe, C. Heiss, dan M. Kelm. 2005. Cocoa polyphenols and inflammatory mediators. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 81: 304-312.
- Syarif, A., A. Estuningtyas, A. Setiawati, A. Muchtar, A. Arif, B. Bahry, F. D. Suyatna, H. R. Dewoto, H. Utama, I. Darmansjah, M. S. S. Wiria, Nafrialdi, P. F. Wilmana, P. Ascobat, R. Setiabudy, R. Sunaryo, S. Wardhini, S. K. Suherman, S. G. Gunawan, V. H. S. Ganiswarna, W. Arozal, Y. Mariana, Y. H. Istiantoro, Z. D. Sadikin, M. Louisa, dan Elysabeth. 2012. *Farmakologi dan Terapi*. 5<sup>th</sup> ed. Jakarta: Badan Penerbit FKUI.
- Tjolsen, A., O. G. Berge, S. Hunskaar, J. H. Rosland dan K. Hole. 1992. The formalin test: an evaluation of the method. *Elsevier Science Publisher*. 51: 5-17.
- United States Department of Agriculture. 2016. *Classification for Kingdom Plantae Down to Species Theobroma cacao L*. California: NRCS.
- Valle J. D. 2005. *Peptic Ulcer Disease and Related Disorder*. 17<sup>th</sup> ed. US: McGrawHill.
- Wahyudi T., T. R. Panggabean, dan Pujiyanto. 2008. *Panduan Lengkap Kakao*. Jakarta: Penebar Swadaya.

## LAMPIRAN

Lampiran 3.1 Surat Identifikasi Tanaman Kakao (*Theobroma cacao L.*)KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
FAKULTAS PERTANIANJl. Kalimantan Kampus Tegalboto, Jember 68121; Telp.: (0331) 334054, 339596  
Fax.: (0331) 338422, e-mail: admin.faperta@unej.ac.id

Nomor : 5311/UN25.1.3/PS.8/2017  
Lampiran : 2 (lembar) lembar  
Hal : Hasil Identifikasi Tanaman

10 Oktober 2017

Yth. : Wakil DEKAN I  
Fakultas Kedokteran  
Universitas Jember

Menindaklanjuti surat saudara Nomor: 1807 dan 1808/UN25.1.11/LT/2017, tanggal 26 September 2017 tentang Permohonan Ijin Penelitian untuk identifikasi tanaman, maka bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi morfologis 1 (satu) set contoh tanaman lengkap yang terdiri dari daun beserta rantingnya dan buah beserta bijinya (terlampir) dalam rangka penyusunan skripsi, atas nama:

1. Faradilla Praginta, S. (NIM. 142010101089), dan
2. Yuli Lusiana Sari (NIM. 142010101084).

Atas kepercayaannya disampaikan terimakasih.



Wakil Dekan II,  
Soedradjad, M.T.  
95707181984031001

Tembusan:

1. Mahasiswa yang bersangkutan

## HASIL IDENTIFIKASI MORFOLOGIS CONTOH TUMBUHAN

1.	MORFOLOGI DAUN	
	a. Bangun Daun	Memanjang ( <i>oblongus</i> )
	b. Tepi Daun	Rata ( <i>integer</i> )
	c. Pangkal Daun	Meruncing ( <i>acuminatus</i> )
	d. Ujung Daun	Meruncing ( <i>acuminatus</i> )
	e. Tulang Daun	Menyirip ( <i>penninervis</i> ) dan menonjol pada bagian bawah permukaan daun.
	f. Permukaan Atas	Licin ( <i>laevis</i> )
	g. Permukaan Bawah	Kasap
	h. Bentuk Tangkai Daun	Bulat Telur
	i. Warna Daun	Hijau
	j. Duduk Daun	Menyebar
	k. Jenis Daun	Tunggal ( <i>folium simplex</i> )
2.	MORFOLOGI BATANG	
	a. Bentuk Batang	
	b. Permukaan Batang	Batang tanaman tidak disertakan sehingga tidak teridentifikasi
	c. Arah Tumbuh	
	d. Percabangan	
3.	MORFOLOGI AKAR	
	Sistem perakaran	Akar tanaman tidak disertakan sehingga tidak teridentifikasi
4.	MORFOLOGI BUNGA	Bunga tanaman tidak disertakan sehingga tidak teridentifikasi.
5.	MORFOLOGI BUAH	
	a. Buah sejati tunggal berbentuk bulat lonjong ( <i>cundeamor</i> ) dengan permukaan kasar.	
	b. Buah buni dengan daging lunak.	
	c. Bentuk buah Oblong.	
	d. Pangkal buah langsing	
	e. Ujung buah meruncing	
	f. Alur buah agak dalam	
6.	MORFOLOGI BIJI	
	a. Biji bulat besar dan diselimuti lapisan lunah berwarna putih.	
	b. Kotiledon berwarna putih	
7.	MODIFIKASI ORGAN	
	a. Jenis Modifikasi	Tidak ada
	b. Lain-Lain	Tidak ada

**Kesimpulan:**

Berdasar ciri morfologis yang ada, khususnya pada karakter daun, buah dan biji, tumbuhan tersebut benar tumbuhan Kakao (*Theobroma cacao* L.) tipe Criollo Klon DRC16 (atau disebut Kakao mulia atau kakao edel atau *java cacao*).



Jember, 10 Oktober 2017  
Pelaksana Identifikasi  
PLP Laboratorium Agronomi,

Muhammad Sugiono  
NIP. 196712182001121001

**Tanaman yang di Indentifikasi**



Susunan Daun pada Tangkai



Permukaan bagian Bawah (kiri) dan Atas (kanan)

**DAUN TANAMAN**



Buah



Buah dan Biji  
**BUAH DAN BIJI**



Biji

Jember, 10 Oktober 2017  
Pelaksana Identifikasi  
PLP Laboratorium Agronomi,



  
Muhammad Sugiono  
NIP. 196712182001121001

## Lampiran 3.2 Surat Persetujuan Etik Penelitian



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
KOMISI ETIK PENELITIAN  
Jl. Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877 Jember 68121 – Email :  
fk\_unej@telkom.net

---

**KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK**  
*ETHICAL APPROVA*  
Nomor : 1.173 /H25.1.11/KE/2017

Komisi Etik, Fakultas Kedokteran Universitas Jember dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul :

*The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Jember University, With regards of the protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled :*

**UJI EFEKTIVITAS ANALGESIK EKSTRAK KULIT KAKAO (*Theobroma cacao L.*) TERHADAP TERHADAP LICKING TIME MENCIT YANG DIINDUKSI FORMALIN**

Nama Peneliti Utama : Yuli Lusiana Sari  
*Name of the principal investigator*

NIM : 142010101084

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember  
*Name of institution*

Dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.  
*And approved the above mentioned proposal.*

Jember, 20 Oktober 2017  
Ketua Komisi Etik Penelitian



dr. Rini Riyanti, Sp.PK

**Tanggapan Anggota Komisi Etik**

(Diisi oleh Anggota Komisi Etik, berisi tanggapan sesuai dengan butir-butir isian diatas dan telaah terhadap Protokol maupun dokumen kelengkapan lainnya)

*Review Proposal* :

- Pemilihan, perawatan, perlakuan, pengorbanan dan pemusnahan hewan coba mengacu pada buku pedoman etik penelitian kesehatan ( Penggunaan hewan coba dengan prinsip 3R : *Reduced, Reused, Redefined*)
- Mohon diperhatikan kontrol kualitas pembuatan ekstrak kulit kakao agar didapatkan kadar yang diinginkan.
- Pengamatan dilakukan oleh minimal 2 orang serta menggunakan metode blinding.
- Saran : Semua hewan coba harus bebas nyeri setelah perlakuan dengan cara pemberian anti nyeri sesuai dosis (ditampilkan dialur penelitian dan prosedur penelitian)

Mengetahui  
Ketua Komisi Etik Penelitian



dr. Rini Riyanti, Sp.PK

Jember, 10 Oktober 2017  
Reviewer

dr. Desie Dwi Wisudanti, M.Biomed

### Lampiran 3.3 Perhitungan Dosis Berdasarkan Rata-rata Berat Badan Hewan Coba

Kelompok	Rata-rata Berat Badan	Dosis Ekstrak Kulit Kakao	Pemberian Ekstrak Kulit Kakao	Volume Pelarut
K1	23,136 g	0,25 mg/gBB	5,784 mg	0,2 ml
K2	26,276 g	0,5 mg/gBB	13,138 mg	0,2 ml
K3	26,886 g	1 mg/gBB	26,886 mg	0,2 ml
K4	22,486 g	2 mg/gBB	44,972 mg	0,2 ml
K5	28,934 g	4 mg/gBB	115,736 mg	0,2 ml

Kelompok	Rata-rata Berat Badan	Dosis Natrium Diklofenak	Pemberian Natrium Diklofenak	Volume Pelarut
K(+)	22,955 g	0,00448 mg/gBB	0,102838 mg	0,2 ml

### Lampiran 3.4 Volume Maksimal Larutan yang Dapat Diberikan pada Hewan

Jenis Hewan	Volume Maksimal (ml) sesuai Jalur Pemberian				
	i.v.	i.m.	i.p.	s.c.	p.o.
Mencit (20-30 gr)	0,5	0,05	1,0	0,5-1,0	1,0
Tikus (100 gr)	1,0	0,1	2-5	2-5	5,0
Hamster (50 gr)	-	0,1	1-2	2,5	2,5
Marmot (250 gr)	-	0,25	2-5	5,0	10,0
Merpati (300 gr)	2,0	0,5	2,0	2,0	10,0
Kelinci (2,5 kg)	5-10	0,5	10-20	5-10	20,0
Kucing (3 kg)	5-10	1,0	10-20	5-10	50,0
Anjing (5 kg)	10-20	5,0	20-50	10,0	100,0

i.v : intravena  
i.m : intramuscular  
i.p : intraperitonal  
s.c : subcutan  
p.o : peroral

Sumber: Suhardjono (1995)

Lampiran 3.5 Dokumentasi Prosedur Penelitian



Pemisahan kulit kakao



Pemotongan kulit kakao



Penyaringan maserat



Pembuatan serbuk halus



Ekstrak kental



Ekstrak kental



Penyondean



Respons menjilat



Lampiran 4.1 Data *Licking Time* Fase pertama dan Fase kedua

Kelompok	Sampel	<i>Licking Time (sec)</i>	
		Fase pertama	Fase kedua
K(+)	1	9	51
	2	0	51
	3	0	39
	4	3	41
K(-)	1	4	243
	2	5	187
	3	4	182
	4	3	195
K1	1	5	124
	2	2	28
	3	3	6
	4	2	2
K2	1	2	116
	2	1	2
	3	2	31
	4	0	2
K3	1	2	35
	2	1	13
	3	2	0
	4	0	0
K4	1	7	6
	2	5	39
	3	4	171
	4	0	0
K5	1	2	4
	2	1	91
	3	1	146
	4	4	2

### Lampiran 4.2 Hasil Uji Normalitas *Shapiro Wilk*

Hasil uji normalitas pada data *licking time* fase pertama

Kelompok	<i>Test of Normality</i>		
	<i>Statistic</i>	<i>Shapiro Wilk</i> df	<i>Sig.</i>
Ekstrak kulit kakao 0,25 mg/gBB	0,827	4	0,161
Ekstrak kulit kakao 0,5 mg/gBB	0,863	4	0,272
Ekstrak kulit kakao 1 mg/gBB	0,863	4	0,272
Ekstrak kulit kakao 2 mg/gBB	0,953	4	0,734
Ekstrak kulit kakao 4 mg/gBB	0,827	4	0,161
NACMC 1%	0,945	4	0,683
Natrium diklofenak 4,48 mg/kgBB	0,827	4	0,161

Hasil uji normalitas pada data *licking time* fase kedua

Kelompok	<i>Test of Normality</i>		
	<i>Statistic</i>	<i>Shapiro Wilk</i> df	<i>Sig.</i>
Ekstrak kulit kakao 0,25 mg/gBB	0,781	4	0,073
Ekstrak kulit kakao 0,5 mg/gBB	0,793	4	0,090
Ekstrak kulit kakao 1 mg/gBB	0,840	4	0,196
Ekstrak kulit kakao 2 mg/gBB	0,791	4	0,087
Ekstrak kulit kakao 4 mg/gBB	0,866	4	0,283
NACMC 1%	0,795	4	0,093
Natrium diklofenak 4,48 mg/kgBB	0,799	4	0,100

### Lampiran 4.3 Hasil Uji Homogenitas

Hasil uji homogenitas pada data *licking time* fase pertama

<i>Test of Homogeneity of Variance</i>			
<i>Lavene Statistic</i>	<i>df1</i>	<i>df1</i>	<i>Sig.</i>
1,978	6	21	0,115

Hasil uji homogenitas pada data *licking time* fase kedua

<i>Test of Homogeneity of Variance</i>			
<i>Lavene Statistic</i>	<i>df1</i>	<i>df1</i>	<i>Sig.</i>
2,894	6	21	0,032

**Lampiran 4.4 Hasil Uji One Way ANOVA dan Post Hoc Games-Howell**

Hasil uji *One Way ANOVA* pada data *licking time* fase pertama

<i>ANOVA</i>					
	<i>Sum of Squares</i>	<i>df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F</i>	<i>Sig</i>
<i>Between Groups</i>	32,929	6	5,488	1,158	0,365
<i>Within Groups</i>	99,500	21	4,738		
<i>Total</i>	132,429	27			

Hasil uji *One Way ANOVA* dan *Post Hoc Games-Howell* pada data *licking time* fase kedua

<i>ANOVA</i>					
	<i>Sum of Squares</i>	<i>df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F</i>	<i>Sig</i>
<i>Between Groups</i>	93579,714	6	15596,619	5,869	0,001
<i>Within Groups</i>	55809,250	21	2657,583		
<i>Total</i>	149388,964	27			

**Multiple Comparisons**

**Dependent Variable: Lickingtime**

	(I) Kelompo k	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
<b>Games- Howell</b>	<b>dosis 0,25</b>	dosis 0,5	2,250	39,290	1,000	-161,73	166,23
		dosis 1	28,000	29,746	,943	-132,50	188,50
		dosis 2	-14,000	49,104	1,000	-226,39	198,39
		dosis 4	-20,750	45,327	,999	-212,54	171,04
		kontrol negatif	-161,750*	31,826	,040	-313,45	-10,05
	<b>dosis 0,5</b>	kontrol positif	-5,500	28,756	1,000	-174,78	163,78
		dosis 0,25	-2,250	39,290	1,000	-166,23	161,73
		dosis 1	25,750	28,200	,950	-124,79	176,29
		dosis 2	-16,250	48,183	1,000	-227,31	194,81
		dosis 4	-23,000	44,328	,997	-212,27	166,27
	<b>dosis 1</b>	kontrol negatif	-164,000*	30,386	,030	-306,52	-21,48
		kontrol positif	-7,750	27,153	1,000	-167,24	151,74
		dosis 0,25	-28,000	29,746	,943	-188,50	132,50
		dosis 0,5	-25,750	28,200	,950	-176,29	124,79
		dosis 2	-42,000	40,776	,918	-272,57	188,57
	dosis 4	-48,750	36,139	,804	-250,06	152,56	
	kontrol negatif	-189,750*	16,260	,001	-263,44	-116,06	

	kontrol positif	-33,500	8,855	,124	-78,40	11,40
<b>dosis 2</b>	dosis 0,25	14,000	49,104	1,000	-198,39	226,39
	dosis 0,5	16,250	48,183	1,000	-194,81	227,31
	dosis 1	42,000	40,776	,918	-188,57	272,57
	dosis 4	-6,750	53,220	1,000	-229,85	216,35
	kontrol negatif	-147,750	42,317	,161	-367,39	71,89
<b>dosis 4</b>	kontrol positif	8,500	40,059	1,000	-229,40	246,40
	dosis 0,25	20,750	45,327	,999	-171,04	212,54
	dosis 0,5	23,000	44,328	,997	-166,27	212,27
	dosis 1	48,750	36,139	,804	-152,56	250,06
	dosis 2	6,750	53,220	1,000	-216,35	229,85
<b>kontrol negatif</b>	kontrol negatif	-141,000	37,870	,128	-331,76	49,76
	kontrol positif	15,250	35,329	,998	-193,99	224,49
	dosis 0,25	161,750*	31,826	,040	10,05	313,45
	dosis 0,5	164,000*	30,386	,030	21,48	306,52
	dosis 1	189,750*	16,260	,001	116,06	263,44
<b>kontrol positif</b>	dosis 2	147,750	42,317	,161	-71,89	367,39
	dosis 4	141,000	37,870	,128	-49,76	331,76
	kontrol positif	156,250*	14,369	,006	75,93	236,57
	dosis 0,25	5,500	28,756	1,000	-163,78	174,78
	dosis 0,5	7,750	27,153	1,000	-151,74	167,24
<b>kontrol negatif</b>	dosis 1	33,500	8,855	,124	-11,40	78,40
	dosis 2	-8,500	40,059	1,000	-246,40	229,40
	dosis 4	-15,250	35,329	,998	-224,49	193,99
	kontrol negatif	-156,250*	14,369	,006	-236,57	-75,93

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.