



**POTENSI EKSTRAK ETANOL BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L.)
TERHADAP PENGHAMBATAN *FIRING* TUBUL NEMATOSISTA
RACUN UBUR-UBUR (*Physalia utriculus*) SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

Oleh

**Sarwendah Siswi Winasis
NIM 152010101040**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2019**



**POTENSI EKSTRAK ETANOL BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L.)
TERHADAP PENGHAMBATAN *FIRING* TUBUL NEMATOSISTA
RACUN UBUR-UBUR (*Physalia utriculus*) SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Pendidikan Dokter (S1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran (S.Ked)

Oleh

**Sarwendah Siswi Winasis
NIM 152010101040**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2019**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Orangtua tercinta, Ayahanda Bambang Ponco Sudarmo dan Ibunda Susilaningtyas yang selalu memberikan dukungan, bimbingan, semangat, kasih sayang, doa, dan pengorbanan tiada henti;
2. Adik tercinta Titis Retno Mumpuni yang selalu memberikan semangat; dan
3. Para Bapak/Ibu Guru sedari taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi yang telah memberikan ilmu dan mendidik saya dengan penuh kesabaran untuk menjadi manusia yang berilmu dan bertakwa.

MOTO

Agar engkau orang Jawa bisa memberi pengertian kepada seluruh manusia Jawa, juga manusia lain di jagat ini. Agar seluruh manusia bisa jumbuh (bersenyawa) dengan Gusti, yang melampaui segalanya, yang tak dapat dibatasi oleh apapun. Tetapi manusia keras kepala kepada Gusti yang memberi hidup dan mati bagi seluruh keberadaan. *)



*) Dewantoro, S. H. 2017. *Suwung*. Tangerang Selatan: PT Kaurama Buana Antara.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Sarwendah Siswi Winasis

NIM : 152010101040

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Potensi Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) Terhadap Penghambatan *Firing* Tubul Nematosisista Racun Ubur-Ubur (*Physalia utriculus*) Secara *In Vitro*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, 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 manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 27 Januari 2019
Yang menyatakan,

Sarwendah Siswi Winasis
NIM. 152010101040

SKRIPSI

**POTENSI EKSTRAK ETANOL BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L.)
TERHADAP PENGHAMBATAN *FIRING* TUBUL NEMATOSISTA
RACUN UBUR-UBUR (*Physalia utriculus*) SECARA *IN VITRO***

Oleh

Sarwendah Siswi Winasis
NIM 152010101040

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : dr. Al Munawir, M.Kes., Ph.D.

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Adelia Handoko, M.Si.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Potensi Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) Terhadap Penghambatan *Firing* Tubul Nematosis Racun Ubur-Ubur (*Physalia utriculus*) Secara *In Vitro*” karya Sarwendah Siswi Winasis telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji:

Penguji I,

Penguji II,

dr. Bagus Hermansyah, M.Biomed.
NIP. 19830405 200812 1 001

dr. Ayu Munawaroh Aziz, M.Biomed.
NIP. 19890313 201404 2 002

Penguji III,

Penguji IV,

dr. Al Munawir, M.Kes., Ph.D.
NIP. 19690901 199903 1 003

dr. Adelia Handoko, M.Si.
NIP. 19890107 201404 2 001

Mengesahkan
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember,

dr. Supangat, M.Kes., Ph.D., Sp.BA.
NIP. 19730424 199903 1 002

RINGKASAN

Potensi Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) Terhadap Penghambatan *Firing* Tubul Nematosisista Racun Ubur-Ubur (*Physalia utriculus*) Secara *In Vitro*; Sarwendah Siswi Winasis, 152010101040; 2018; 58 halaman; Jurusan Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Diperkirakan 150 juta kasus envenomasi akibat sengatan ubur-ubur terjadi setiap tahun secara global. Envenomasi ubur-ubur terjadi akibat proses *firing* tubul nematosisista. *Firing* tubul berfungsi untuk melumpuhkan mangsa dan sebagai mekanisme pertahanan diri. Kendati *firing* tubul nematosisista merupakan reaksi fisiologis yang menguntungkan bagi ubur-ubur, sengatan yang diakibatkan menjadi suatu permasalahan penting dalam bidang toksikologi karena merugikan manusia. *Firing* tubul spesies *Physalia utriculus* perlu diwaspadai karena dapat menembus lapisan integumen hanya dalam waktu 3 mili detik sehingga menyebabkan gangguan sistemik secara cepat dan tiba-tiba dengan berbagai tingkat keparahan berupa rasa gatal, hemolisis, sitolisis, neurotoksik, kardiotosik, bahkan hingga berefek letal. Pelbagai cara penanggulangan telah dilakukan sedari onset pertama sengatan dengan harapan dapat menyelamatkan kehidupan dan mencegah suatu keparahan melalui pemberian asam asetat (cuka), etanol, natrium bikarbonat, aluminium sulfat, air hangat, air dingin, air laut, bahkan urin.

Dekade ini penelitian obat berbasis bahan herbal kian dikembangkan. Salah satu tumbuhan yang dikenal dan terbukti memiliki banyak khasiat di bidang kesehatan ialah kakao (*Theobroma cacao* L.). Kakao, terutama bijinya, memiliki persentase kandungan fitokimia yang melimpah apabila dibandingkan dengan komponen lainnya. Meskipun memiliki banyak kandungan fitokimia, hanya senyawa polifenol (*procyanidins*, *(-)-epicatechin*, *catechins*) dan asam organik yang diduga dapat memengaruhi mekanisme *firing* tubul nematosisista.

Tujuan penelitian ini ialah untuk mengetahui potensi ekstrak etanol biji kakao (*T. cacao* L.) terhadap penghambatan *firing* tubul nematosisista racun ubur-ubur (*P. utriculus*) secara *in vitro*. Manfaat keilmuan penelitian ini ialah dapat

dijadikan sebagai landasan teori dan dasar pengembangan penelitian selanjutnya khususnya bidang toksikologi. Selain itu, penelitian ini dapat dijadikan sebagai bahan pertimbangan bagi dokter dalam memberikan pertolongan pertama pada kasus senagatan *P. utriculus*.

Penelitian dilakukan pada bulan Januari 2019 di Laboratorium Kimia Fakultas Teknologi Hasil Pangan Politeknik Negeri Jember dan Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Rancangan penelitian yang digunakan ialah *post test only control group design*. Sampel terdiri atas 32 preparat racun ubur-ubur berkonsentrasi 100 mg/ml yang dibagi menjadi 8 kelompok, yaitu 1 kelompok kontrol normal, 1 kelompok kontrol positif, 1 kelompok kontrol negatif, dan 5 kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) berturut-turut berkonsentrasi 20%, 2%, 0,2%, 0,02%, dan 0,002%. Pengamatan dilakukan dengan menghitung persentase jumlah nematosista yang mengalami *firing* yang gambarnya telah dikalibrasi menggunakan aplikasi AmScope.

Hasil penelitian didapatkan rata-rata persentase *firing* pada kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol biji kakao 20%, 2%, 0,2%, 0,02%, 0,002% berturut-turut ialah $48,24 \pm 5,37$; $40,62 \pm 7,10$; $29,45 \pm 5,39$; $37,60 \pm 9,78$; $41,11 \pm 3,92$. Rata-rata persentase *firing* pada kelompok kontrol negatif sebesar $52,44 \pm 2,98$ dan kelompok kontrol positif sebesar $37,97 \pm 5,57$. Uji normalitas dan homogenitas menunjukkan data terdistribusi normal dan homogen. Analisis *One Way Anova* menunjukkan nilai signifikansi 0,001 ($p < 0,05$) yang berarti terdapat perbedaan bermakna pada ≥ 2 kelompok, kemudian dilakukan uji analisis *Post Hoc Bonferoni* untuk mengetahui perbedaan signifikansi pada masing-masing kelompok. Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak etanol biji kakao konsentrasi 0,2% paling berpotensi menghambat *firing* tubul nematosista racun ubur-ubur (*Physalia utriculus*) secara *in vitro*.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi berjudul “Potensi Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) Terhadap Penghambatan *Firing* Tubul Nematocista Racun Ubur-Ubur (*Physalia utriculus*) Secara *In Vitro*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

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

1. dr. Supangat, M.Kes., Ph.D., Sp.BA. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan selama menempuh pendidikan kedokteran di Universitas Jember;
2. dr. Al Munawir, M.Kes., Ph.D. selaku Dosen Pembimbing Utama dan dr. Adelia Handoko, M.Si. selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga, dan perhatian dalam penulisan skripsi ini;
3. dr. Bagus Hermansyah, M.Biomed. selaku Dosen Penguji I dan dr. Ayu Munawaroh Aziz, M.Biomed. selaku Dosen Penguji II yang juga telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga, dan perhatian, serta segala saran yang membangun dalam penulisan skripsi ini, saya sampaikan terima kasih;
4. seluruh staf pengajar dan karyawan Fakultas Kedokteran Universitas Jember atas bimbingan dan bantuannya selama menjadi mahasiswa;
5. Kakek tercinta, Bapak Soepandi yang selalu memberikan dukungan dan doa sepanjang waktu;
6. Orangtua tercinta, Ayahanda Bambang Ponco Sudarmo dan Ibunda Susilaningtyas yang selalu memberikan dukungan, bimbingan, semangat, kasih sayang, doa, dan pengorbanan tiada henti;
7. Adik tercinta Titis Retno Mumpuni yang selalu memberikan semangat;

8. rekan kerja sepejuangan dalam penelitian Adinningtyas Intansari dan Mbak Graitia Yuli Ambarwati atas kerja sama dan bantuan yang diberikan selama penelitian;
4. sahabat tercinta Annisa Salsabela, Nabela Karima Putri, Arista Prima Nugrahani, dan keluarga besar Angkatan 2015 (Coccyx) Fakultas Kedokteran Universitas Jember yang selalu memberikan semangat, dukungan, dan bantuan selama menempuh pendidikan di Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
9. keluarga baru dalam memaknai hidup 56 hari. Para 35 pemuda pengguncang dunia yang sekaligus merupakan sosok-sosok sahabat dan pemuda hebat. Terima kasih keluarga KKN PPM 2018 atas semangat dan dukungan yang telah diberikan. Perlahan tetapi pasti, semoga terwujud segala cita-cita muliamu;
10. semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu, terima kasih atas segala bantuan dan kerjasamanya.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 27 Januari 2019

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBING	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 <i>Physalia utriculus</i>	5
2.1.1 Taksonomi	5
2.1.2 Morfologi	5
2.1.3 Habitat	7
2.1.4 Siklus Hidup	7
2.1.5 Ekologi	8
2.2 Nematosista	9
2.2.1 Morfologi Nematosista	9
2.2.2 Morfogenesis Nematosista	10
2.2.3 Patofisiologi <i>Firing</i> Tubul Nematosista yang Telah Diisolasi	11
2.3 Kandungan dan Efek Envenomasi Racun <i>Physalia</i> <i>utriculus</i> terhadap Fisiologi Tubuh Manusia	13
2.4 Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	15
2.4.1 Taksonomi	15
2.4.2 Morfologi	16
2.4.3 Kandungan Fitokimia Biji Kakao dan Produk Olahan Kakao	16
2.5 Kerangka Konseptual Penelitian	23
2.6 Hipotesis Penelitian	24
BAB 3. METODE PENELITIAN	25
3.1 Jenis Penelitian	25
3.2 Rancangan Penelitian	25
3.3 Populasi dan Sampel Penelitian	26

3.3.1	Populasi Penelitian	26
3.3.2	Sampel Penelitian	26
3.3.3	Besar Sampel Penelitian	26
3.4	Tempat dan Waktu Penelitian	26
3.5	Variabel Penelitian	27
3.5.1	Variabel Bebas	27
3.5.2	Variabel Terikat	27
3.5.3	Variabel Terkendali	27
3.6	Definisi Operasional	27
3.7	Alat dan Bahan Penelitian	28
3.7.1	Alat Penelitian	28
3.7.2	Bahan Penelitian	28
3.8	Prosedur Penelitian	29
3.8.1	Uji Kelayakan Etik	29
3.8.2	Persiapan Ubur-ubur (<i>Physalia utriculus</i>)	29
3.8.3	Proses Isolasi Racun <i>Physalia utriculus</i>	29
3.8.4	Pembuatan Ekstrak Etanol Biji Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	30
3.8.5	Perlakuan dan Pengamatan Kelompok Sampel ...	31
3.9	Analisis Data	32
3.10	Alur Penelitian	33
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN		34
4.1	Hasil Penelitian dan Analisis Data	34
4.1.1	Hasil Pengamatan Jumlah <i>Firing</i> Tubul Nematosisista	34
4.1.2	Analisis Statistik	37
4.2	Pembahasan	38
BAB 5. PENUTUP		42
5.1	Kesimpulan	42
5.2	Saran	42
DAFTAR PUSTAKA		43
LAMPIRAN		49

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Perbandingan komposisi fitokimia antara biji kakao dengan kulit kakao	17
Tabel 2.2 Perbandingan kandungan fitokimia antara biji kakao dengan produk olahan biji kakao	17
Tabel 2.3 Fitokimia biji kakao dan pembagian kelas senyawa yang terkandung	19
Tabel 2.4 Rata-rata kandungan mineral biji kakao dan produk olahan biji kakao dalam mg/100 g	21
Tabel 2.5 Nilai pH biji kakao pada beberapa negara	22
Tabel 3.1 Definisi operasional variabel bebas dan terikat	27
Tabel 4.1 Rata-rata dan standar deviasi jumlah <i>firing</i> tubul nematosista setiap kelompok (%)	36
Tabel 4.2 Hasil uji <i>Post Hoc Bonferoni</i>	37

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1	Klasifikasi filum Cnidaria 5
Gambar 2.2	Morfologi <i>P. utriculus</i> 6
Gambar 2.3	Siklus hidup ubur-ubur 8
Gambar 2.4	Struktur nematosista dan skema <i>firing</i> tubul nematosista 10
Gambar 2.5	Morfogenesis nematosista 11
Gambar 2.6	Mekanisme <i>firing</i> tubul nematosista yang diisolasi 12
Gambar 2.7	Mekanisme <i>firing</i> tubul nematosista <i>in situ</i> atau yang tidak diisolasi 13
Gambar 2.8	Perbedaan gambaran mikroskopik antara nematosista intak dengan nematosista yang mengalami <i>firing</i> 13
Gambar 2.9	Penetrasi tubul nematosista pada sistem integumen 14
Gambar 2.10	Anatomi buah kakao potongan melintang 16
Gambar 2.11	Struktur kimia <i>procyanidins</i> , <i>(-)-epicatechin</i> , <i>catechins</i> , kafein, dan theobromin 18
Gambar 2.12	Kerangka konsep penelitian 23
Gambar 3.1	Skema rancangan penelitian 25
Gambar 3.2	Skema alur penelitian 33
Gambar 4.1	Gambaran mikroskopik <i>firing</i> tubul nematosista masing-masing kelompok 34
Gambar 4.2	Macam-macam penampakan <i>firing</i> tubul nematosista .. 35
Gambar 4.3	Grafik hasil rata-rata dan standar deviasi jumlah <i>firing</i> tubul nematosista setiap kelompok (%) 36

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 3.1 Halaman Pertama Lembar <i>Ethical Clearance</i>	49
Lampiran 3.2 Halaman Kedua Lembar <i>Ethical Clearance</i>	50
Lampiran 3.3 Dokumentasi Kegiatan Penelitian	51
Lampiran 3.4 Surat Rekomendasi Bebas Plagiasi	54
Lampiran 4.1 Data Penelitian	55
Lampiran 4.2 Uji Normalitas dan Homogenitas	56
Lampiran 4.3 Uji <i>One Way Anova</i>	56
Lampiran 4.4 Uji <i>Post Hoc Bonferroni</i>	57

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Terdapat 100 dari 10.000 spesies ubur-ubur di dunia diketahui berbahaya bagi manusia (Cegolon *et al.*, 2013; Duarte *et al.*, 2014). Diperkirakan 150 juta kasus envenomasi akibat sengatan ubur-ubur terjadi setiap tahun secara global. Pada tahun 1997 di Hawaii dalam waktu dua hari tercatat lebih dari 800 orang mengalami sengatan ubur-ubur. Pada tahun 2002 di Amerika dilaporkan sebanyak 66,3 juta kasus dan tahun 2004 di Australia dilaporkan terdapat 277 kasus (Wilcox *et al.*, 2017; Boulware, 2006). Menurut Mujiono (2010), selama kurun waktu 2005 hingga 2009 di Indonesia didapati laporan sebanyak 13 kasus, 7 diantaranya diakibatkan oleh envenomasi *Physalia utriculus* (*Bluebottle*) yang setiap kasusnya telah mengenai puluhan hingga ratusan korban. Tercatat tahun 2008, terdapat 2 korban jiwa di Kabupaten Situbondo, Jawa Timur dan 1 korban jiwa berlokasi di Kecamatan Jebus, Kepulauan Bangka Belitung.

Envenomasi adalah injeksi racun melalui sengatan atau gigitan hewan berbisa. Envenomasi ubur-ubur terjadi akibat proses *firing* tubul nematosista. Nematosista merupakan organel subseluler berupa kapsul penyengat berisi tubul panjang dan terkumpul yang apabila memperoleh rangsang maka akan mengalami lisis sehingga secara mikroskopis tampak menjulurkan atau menembakkan (*firing*) tubul beracun (Jouiaei *et al.*, 2015; Wicox *et al.*, 2017). Proses yang berperan dalam *firing* tubul nematosista bersifat kompleks, diantaranya dipengaruhi oleh stimulus kimiawi (berkurangnya ikatan Ca^{2+} -polipeptida nematosista) maupun mekanik (tekanan dan sensitisasi reseptor silia) (Salleo *et al.*, 1996; Novak *et al.*, 1993; Kitatani *et al.*, 2015; Lubbock dan Amos, 1981). *Firing* tubul berfungsi untuk melumpuhkan mangsa dan sebagai mekanisme pertahanan diri. Kendati *firing* tubul nematosista merupakan reaksi fisiologis yang menguntungkan bagi ubur-ubur, sengatan yang diakibatkan menjadi suatu permasalahan penting dalam bidang toksikologi karena merugikan manusia. Seringkali manusia menjadi korban akibat tidak sengaja menyentuh tentakel yang dilengkapi oleh 750.000 nematosista pada tiap bagiannya (Remigante *et al.*, 2018; Bais *et al.*, 2017).

Physalia utriculus merupakan salah satu keanekaragaman jenis ubur-ubur pada Samudera Indo-Pasifik yang melingkupi perairan Indonesia (Cegolon *et al.*, 2013). *Firing* tubul spesies *P. utriculus* perlu diwaspadai karena dapat menembus lapisan integumen hanya dalam waktu 3 mili detik sehingga menyebabkan gangguan sistemik secara cepat dan tiba-tiba (Slaughter *et al.*, 2009; Kitatani *et al.*, 2015). Proses envenomasi yang berlangsung cepat dan tiba-tiba termasuk dalam kejadian kegawatdaruratan. Tingkat keparahan yang diakibatkan pasca terinjeksi racun *P. utriculus* dapat berupa rasa gatal, hemolisis, sitolisis, neurotoksik, kardiotoxik, bahkan hingga berefek letal (Calton *et al.*, 1978; Hessinger dan Lenhoff, 1988; Alam dan Qasim, 1991; Tibballs *et al.*, 2011, Kitatani *et al.*, 2015). Pelbagai cara penanggulangan telah dilakukan sedari onset pertama sengatan dengan harapan dapat menyelamatkan kehidupan dan mencegah suatu keparahan melalui pemberian asam asetat (cuka), etanol, natrium bikarbonat, aluminium sulfat, air hangat, air dingin, air laut, bahkan urin (Giordano *et al.*, 2005; Loten *et al.*, 2006; Yoshimoto dan Yanagihara, 2002; Wilcox dan Yanagihara, 2016; Bais *et al.*, 2017; Remigante *et al.*, 2018).

Dekade ini penelitian obat berbasis bahan herbal kian dikembangkan. Salah satu tumbuhan yang dikenal dan terbukti memiliki banyak khasiat di bidang kesehatan ialah kakao (*Theobroma cacao* L.). Kakao, terutama bijinya, memiliki persentase kandungan fitokimia yang melimpah apabila dibandingkan dengan komponen lainnya. Kandungan fitokimia biji kakao secara garis besar terdiri atas *methylxanthines* dan polifenol yang meliputi golongan *flavonoid phenols* dan *nonflavonoid phenols*. Komposisi fitokimia yang dominan terkandung ialah *flavonoid phenols* (*procyanidins*, *(-)-epicatechin*, *catechins*) serta *methylxanthines* (theobromin dan kafein). Tidak hanya mengandung polifenol dan *methylxanthines*, biji kakao juga mengandung beberapa mineral berupa kalsium (Ca^{2+}), seng (Zn), dan kobalt (Co) serta asam organik berupa asam asetat, asam sitrat, dan asam oksalat (Kim *et al.*, 2014; Ieggli *et al.*, 2011; Cinquanta *et al.*, 2016; Belitz dan Grosch, 1999). Meskipun memiliki banyak kandungan fitokimia, hanya senyawa polifenol dan asam organik yang diduga dapat memengaruhi

mekanisme *firing* tubul nematosista (Salleo *et al.*, 1996; Novak *et al.*, 1993; Morabito *et al.*, 2014).

Keberadaan komponen polifenol berperan sebagai agen antioksidan dengan menurunkan kadar *stress oxidative* yang dipicu oleh sensitisasi NO terhadap reseptor silia di membran nematosista. Kandungan polifenol dalam biji kakao juga memiliki efek sitoprotektif melalui mekanisme ikatan dengan *nematocyst outer wall antigen* (NOWA) atau materi penyusun dinding luar nematosista sehingga integritas sel tetap terjaga dari stimulus eksternal yang bersifat destruktif (Andujar *et al.*, 2012; Tarahovsky *et al.*, 2008; Oteiza *et al.*, 2005; Engel *et al.*, 2002). Keberadaan kandungan asam organik menyebabkan pH asam pada ekstrak kakao (Jinap dan Dimick, 1990). Menurut Morabito *et al.* (2014) keasaman dapat mengurangi kemampuan *firing* nematosista dengan cara mengganggu sistem transpor kanal ion membran nematosista. pH asam juga mengakibatkan nematosista mengalami kolaps sehingga mengurangi kemampuan *firingnya*.

Pemanfaatan ekstrak etanol biji kakao berpotensi untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai pengobatan lini pertama sengatan ubur-ubur. Tata laksana dengan pemberian obat alternatif ekstrak etanol biji kakao diharapkan dapat menjaga integritas sel nematosista supaya racun tidak mengalami eksositosis. Belum ada penelitian maupun jurnal yang membahas pemanfaatan ekstrak tersebut sebagai inhibitor *firing* tubul nematosista. Oleh sebab itu, peneliti memilih topik mengenai terapi yang bersifat kuratif berjudul “Potensi Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) Terhadap Penghambatan *Firing* Tubul Nematocyst Racun Ubur-Ubur (*Physalia utriculus*) Secara *In Vitro*.”

1.2 Rumusan Masalah

Permasalahan yang dapat dirumuskan dalam penelitian ini berdasar latar belakang tersebut, yaitu apakah ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dapat menghambat *firing* tubul nematosista racun ubur-ubur (*Physalia utriculus*) secara *in vitro*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini ialah untuk mengetahui potensi ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap penghambatan *firing* tubul nematosista racun ubur-ubur (*Physalia utriculus*) secara *in vitro*.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kebermanfaatan sebagai berikut:

a. Bagi peneliti

Dapat menambah reverensi ilmiah mengenai potensi ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap penghambatan *firing* tubul nematosista racun ubur-ubur (*Physalia utriculus*).

b. Bagi institusi

Hasil penelitian ini diharapkan dapat mendukung tercapainya visi misi Fakultas Kedokteran Universitas Jember menjadi lembaga pendidikan yang unggul dalam bidang Agromedis.

c. Bagi perkembangan IPTEK

Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan sebagai landasan teoritis mengenai potensi ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap penghambatan *firing* tubul nematosista racun ubur-ubur (*Physalia utriculus*) dan memberikan sumbangsih dalam perkembangan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Kedokteran khususnya pada bidang toksikologi. Selain itu, penelitian ini dapat dijadikan sebagai bahan pertimbangan bagi dokter dalam memberikan pertolongan pertama pada kasus sengatan *Physalia utriculus*.

d. Bagi masyarakat

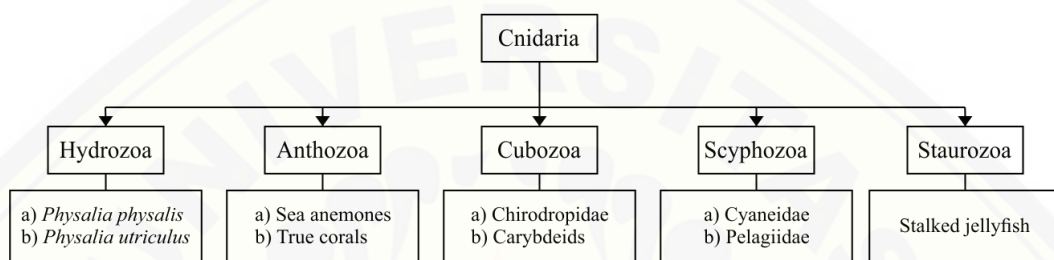
Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah wawasan bagi masyarakat apabila terdapat korban sengatan *Physalia utriculus*.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Physalia utriculus*

2.1.1 Taksonomi

Ubur-ubur termasuk dalam filum *Cnidaria* yang terbagi menjadi lima kelas pada Gambar 2.1, meliputi *Staurozoa*, *Scyphozoa*, *Hydrozoa*, *Cubozoa*, dan *Anthozoa*.



Gambar 2.1 Klasifikasi filum Cnidaria (Sumber: Cegolon *et al.*, 2013)

100 dari 10.000 spesies ubur-ubur diketahui berbahaya bagi manusia, salah satunya ialah spesies *Physalia utriculus* (Cegolon *et al.*, 2013). *P. utriculus* biasa disebut sebagai *La Martinière*, *'Ili Mane'o*, *Palalia*, *Bluebottle*, maupun *Indo-Pacific Portuguese Man-of-War*. Menurut *World Register of Marine Species* (2018), taksonomi atau sistematika *P. utriculus* secara lengkap sebagai berikut:

Kingdom: Animalia

Filum: Cnidaria (Coelenterata)

Kelas: Hydrozoa

Ordo: Siphonophorae

Famili: Physaliidae

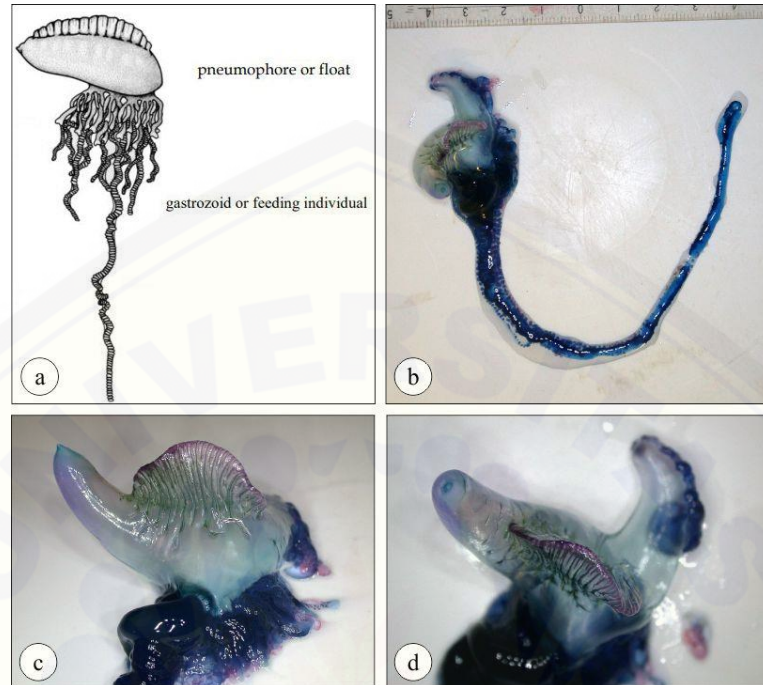
Genus: Physalia

Spesies: *Physalia utriculus*

2.1.2 Morfologi

Apabila dibandingkan dari segi ukuran, maka *P. utriculus* lebih kecil dari pada spesies *P. physalis*. *P. utriculus* memiliki panjang 10 cm, lebar 5–6 cm, dan

dilengkapi tentakel dengan panjang maksimum 2-5 m (Cegolon *et al.*, 2013; Waikiki Aquarium, 2013). Morfologi *P. utriculus* dapat dilihat pada Gambar 2.2.



a) Gambar skematik *Physalia utriculus*, b) *pneumatophore* beserta tentakel *P. utriculus* dilihat dari samping, c) *pneumatophore* *P. utriculus* dilihat dari samping, dan d) *pneumatophore* *P. utriculus* dilihat dari atas

Gambar 2.2 Morfologi *P. utriculus* (Sumber: Waikiki Aquarium, 2013; Codes for Australian Aquatic Biota Oceans and Atmosphere, 2013)

Tubuh *P. utriculus* tersusun atas sebuah medusa (*pneumatophore*) yang berwarna biru transparan dan tiga jenis tentakel, yaitu *dactylozoid*, *gonozoid*, dan *gastrozoid* (Kurlansky, 2004). *Pneumatophore* merupakan kantong berisi udara yang tampak mengapung pada permukaan air laut. *Dactylozoid* merupakan tentakel berumbai panjang dengan nematosista disekitarnya yang berfungsi sebagai alat pertahanan diri dan sebagai alat untuk melumpuhkan mangsa. *Gonozoid* ialah tentakel yang berperan dalam proses reproduksi, sedangkan *gastrozoid* berperan sebagai tentakel dalam proses digesti makanan (Kurlansky, 2004; Waikiki Aquarium, 2013).

Menurut Cegolon *et al.* (2013), *P. utriculus* termasuk dalam filum *Cnidaria*. *Cnidaria* merupakan hewan diploblastik yang berarti hanya memiliki dua lapisan dasar pada tubuhnya, meliputi:

- a. Lapisan ektodermis atau epidermis, yaitu lapisan yang menutupi permukaan tubuh paling luar.
- b. Lapisan endodermis atau gastrodermis, yaitu lapisan dalam yang membatasi dinding perut.

Lapisan ektodermis dan endodermis dibatasi oleh sebuah lapisan tipis bernama mesoglea. Lapisan mesoglea dapat berupa membran tipis maupun membran tebal yang mengandung lendir dan fibrosa. Oleh karena keberadaan lapisan mesoglea ini, ubur-ubur tampak seperti *jelly*. Tidak seperti hewan lain, ubur-ubur tidak memiliki sistem saraf pusat, sistem respirasi, dan sistem kardiovaskuler (Bais *et al.*, 2017).

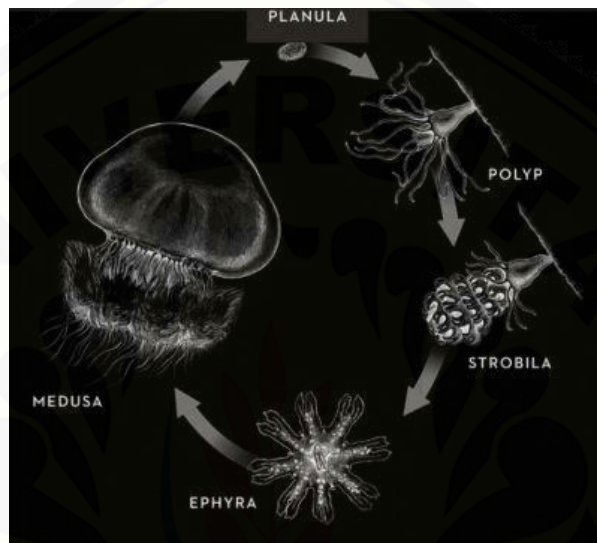
2.1.3 Habitat

Physalia utriculus dapat ditemukan di daerah Samudera Indo-Pasifik, Hindia, dan Atlantik Selatan. *P. utriculus* tidak hanya ditemukan pada perairan beriklim hangat hingga beriklim sedang, tetapi terkadang ubur-ubur ini juga ditemukan pada wilayah perairan Atlantik yang beriklim dingin (Cegolon *et al.*, 2013).

2.1.4 Siklus Hidup

P. utriculus memiliki siklus hidup seksual dan aseksual. Siklus hidupnya juga diklasifikasikan menjadi beberapa stadium: (1) planula (zigot), (2) polip (larva), (3) strobila, (4) efira, dan (5) medusa. Pada fase pertama, planula (zigot) terbentuk akibat fertilisasi antara sel telur dengan sel sperma dari medusa jantan dan betina. Setelah planula berkembang, maka terbentuklah polip (larva). Polip ini hidup berkoloni, bertangkai kecil, berbentuk silinder dengan bagian mulut (oral) menghadap ke atas dan sisi kontralateralnya (aboral) melekat pada karang atau bentukan lain di dasar laut. Polip memiliki lapisan mesoglea yang tipis. Polip menjadi bersegmen-segmen sehingga disebut strobila, kemudian memperbanyak

diri secara aseksual melalui pembentukan tunas yang disebut dengan istilah strobilasi. Medusa pertama yang terbentuk dari peristiwa strobilasi dinamakan efira. Pada fase selanjutnya, satu per satu medusa dewasa mulai melepaskan diri dan berenang bebas di lautan (Whitaker *et al.*, 2006). Fase medusa inilah merupakan bentuk dominan dari ubur-ubur. Siklus hidup ubur-ubur secara garis besar dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Siklus hidup ubur-ubur (Sumber: Berwald, 2017)

2.1.5 Ekologi

a. Mangsa

P. utriculus memiliki mangsa bervariasi dengan karakteristik bertubuh lunak, seperti halnya larva ikan, ikan, *Cephalopoda*, *Chaetognatha*, dan larva *Leptocephalus*. Terbukti pada pemeriksaan autopsi *P. utriculus*, larva ikan memenuhi sekitar 70-90% organ pencernaannya. Sejumlah 120 larva ikan dikonsumsi setiap hari yang rata-rata hidup pada kedalaman 0-5 meter.

Ketika mencari mangsa, *P. utriculus* menjulurkan tentakel hingga mencapai panjang maksimum. Meskipun memiliki tubuh biru transparan, tetapi tiap tentakelnya memiliki pigmen menyerupai warna makanannya sehingga memikat mangsa untuk mendekati *dactylozoid* (tentakel penyengat) (Waikiki Aquarium, 2013). Ubur-ubur tidak mempunyai taring

untuk mengoyak makanan, maka ia hanya memanfaatkan keberadaan tentakel yang dilengkapi sejumlah 750.000 nematosista pada setiap sisinya untuk menyengat tubuh sang mangsa supaya mengalami paralisis dan pingsan. Setelah mangsa tidak berdaya, tentakel *gastrizoid* berkontraksi dan enzim pencernaan bekerja untuk membantu proses digesti makanan tersebut.

b. Predator *Physalia utriculus*

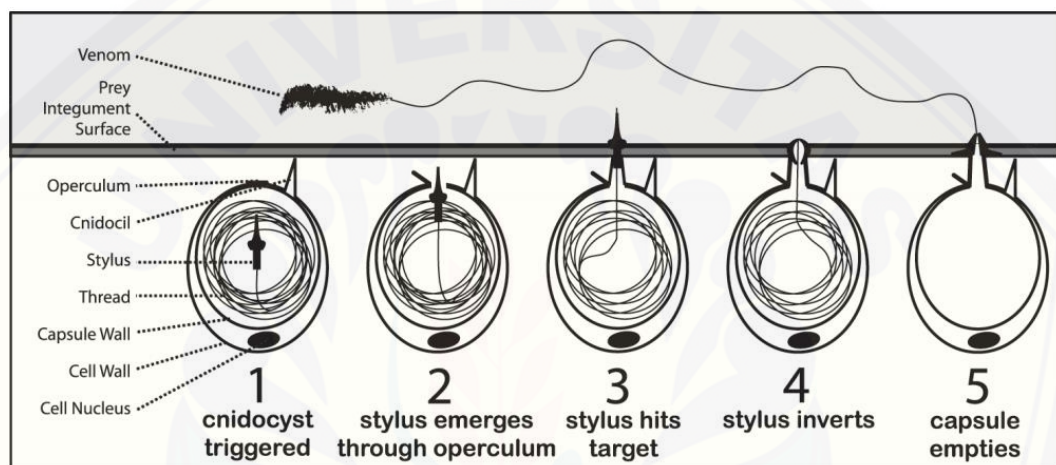
Emerita pacifica, *Nudibranchs*, *Caretta carette*, dan *Dermochelys coriacea* merupakan predator bagi *Physalia utriculus*. *Emerita pacifica*, kepiting laut, tahan terhadap sengatan ubur-ubur. Predator lainnya ialah kura-kura laut, seperti *Caretta carette* dan *Dermochelys coriacea*. *Nudibranchs* atau siput laut juga termasuk golongan predator spesies *P. utriculus*, karena kebal terhadap racun yang diinjeksikan oleh sel nematosista.

2.2 Nematosista

2.2.1 Morfologi Nematosista

Filum Cnidaria memiliki organel subselular bernama nematosista/cnidosista/ cnida yang terletak di dalam sel cnidosit/ nematosit, sedangkan di dalam nematosista terdapat tubul terkumpar berukuran panjang yang dilengkapi oleh duri beracun (Beckmann dan Özbek, 2012). Nematosista utamanya digunakan sebagai alat untuk melumpuhkan mangsa dan sebagai alat pertahanan diri terhadap predator. Nematosista berbentuk kapsul globular seperti telur yang tersusun atas *minicollagens* pada membran dalam dan *nematocyst outer wall antigen* (NOWA) pada membran luar. Nematosista memiliki operkulum (penutup) dan cnidocil di bagian apikal. Cnidocil merupakan mekanoreseptor bersilia pemicu *firing* tubul apabila tersentisasi stimulus mekanik (Salleo *et al.*, 1996). Dinding kapsul dapat menahan tekanan tinggi intrakapsular hingga 150 bar (Beckmann dan Özbek, 2012). Pada spesies *P. utriculus*, jumlah nematosista terbanyak berada pada bagian tentakel (Yanagihara *et al.*, 2002; Beckmann dan Özbek, 2012). Bentuk morfologi nematosista dapat diamati pada Gambar 2.4.

Nematosista secara kimiawi mengandung protein dengan berat molekul 31 dan 132 kDa, 76,3% diantaranya merupakan asam glutamat dan lebih dari 80% cairan intrakapsular nematosista merupakan protein yang bersifat asam. Protein pembentuk nematosista dapat stabil oleh karena berikatan dengan kation divalen berupa Ca^{2+} dan Mg^{2+} . Rasio antara kalsium dan magnesium bervariasi dari satu spesies ke spesies lainnya. Novak *et al.* (1993) menyatakan bahwa Ca^{2+} berjumlah 0,36 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ dalam nematosista kering dan Mg^{2+} berjumlah 0,80 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ dalam nematosista kering yang diukur dengan metode titrasi dan serapan atom.

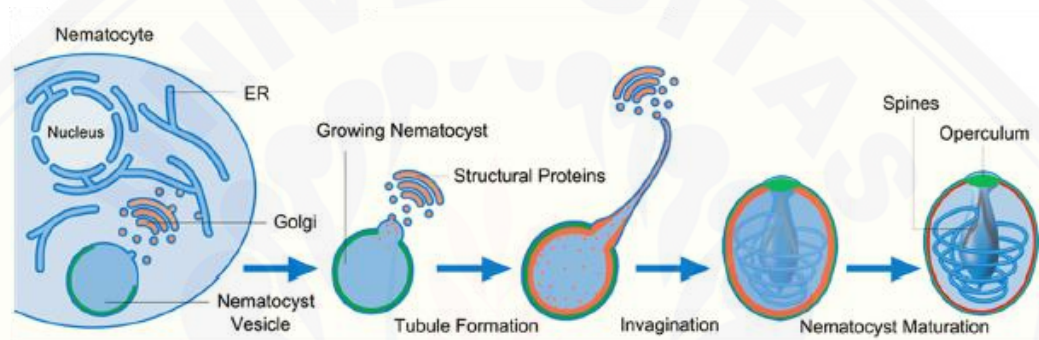


Gambar 2.4 Struktur nematosista dan skema *firing* tubul nematosista (Sumber: Opegard *et al.*, 2009)

2.2.2 Morfogenesis Nematosista

Sel nematosit berasal dari *neuronal stem cell* dan *interstitial stem cells (i-cells)* yang kemudian mengalami spesifikasi membentuk *nematoblast* atau bakal organel subselular nematosista. *Nematoblast* mengalami 3-5 kali pembelahan mitosis menghasilkan sejumlah 8-32 sel yang saling melekat antar bagiannya oleh *cytoplasmic bridges*, kemudian terbentuk vesikel primordial nematosista yang terus berkembang karena mendapat asupan protein dari vesikel sekretori aparatus Golgi yang berada dalam sel nematosit. Pada saat bersamaan, *matrix-like structure* (materi pembentuk dinding kapsul) terbentuk seiring dengan berkembangnya vesikel primordial nematosista. Sedangkan pembentukan tubul (media distribusi racun) terjadi akibat proses tubulasi membran pada apikal vesikel primordial nematosista. Apabila proses tubulasi telah selesai, maka tubul

mengalami invaginasi ke dalam kapsul dan tertutup oleh operculum. Invaginasi tubul menginisiasi maturasi kapsul yang melibatkan pepadatan dan pengerasan pada dinding kapsul oleh struktur protein bernama *minicollagens*. Ketika matur, sel *nematoblast* yang melekat satu sama lain terpisah menjadi sel tunggal disebut nematosista dan mulai bermigrasi dengan jumlah terbanyak berada pada bagian tentakel Filum Cnidaria. Morfogenesis nematosista ini merupakan proses berkelanjutan untuk memperbaharui keberadaannya pasca *firing*. Nematosista diproduksi secara terus-menerus oleh *interstitial stem cells (i-cells)* multipoten. Morfogenesis nematosista dapat diamati pada Gambar 2.5.



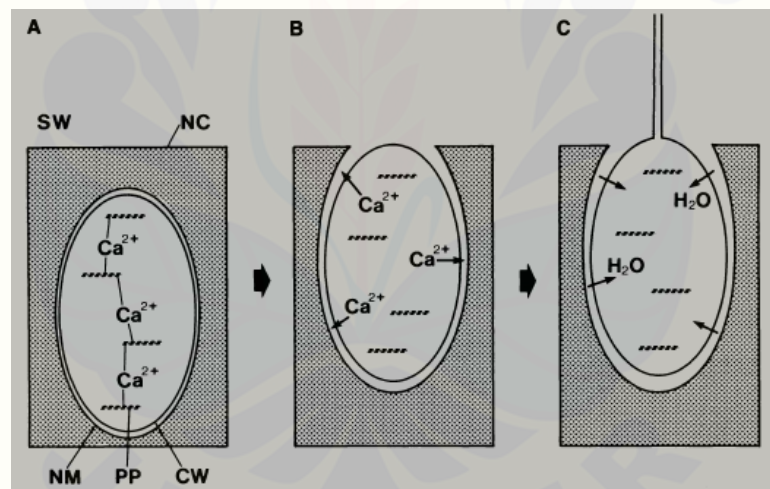
Gambar 2.5 Morfogenesis nematosista (Sumber: Beckmann dan Özbek, 2012)

2.2.3 Patofisiologi *Firing* Tubul Nematosista yang Telah Diisolasi

Belum ditemukan penjelasan yang adekuat perihal apa saja faktor-faktor pemicu mekanisme *firing* tubul nematosista. Secara singkat menurut Lubbock *et al.* (1981), Lubbock dan Amos (1981), serta Salleo *et al.* (1996), nematosista mengalami dua jenis rangsang, pertama kimia dan kedua mekanik. Rangsang kimia berupa berkurangnya ikatan Ca^{2+} dengan polipeptida nematosista, sedangkan rangsang mekanik berupa tekanan maupun sensitisasi reseptor silia atau cnidocil yang berada pada permukaan membran nematosista.

Kalsium merupakan salah satu atom yang melimpah keberadaannya dalam nematosista. Keberadaan Ca^{2+} diperlukan untuk membentuk protein agregat dan menjaga tekanan osmotik internal dengan melakukan ikatan bersama polipeptida (Novak *et al.*, 1993). *Firing* atau meletupnya tubul (media pendistribusian racun) berfungsi untuk melumpuhkan mangsa dan sebagai metode pertahanan diri bagi

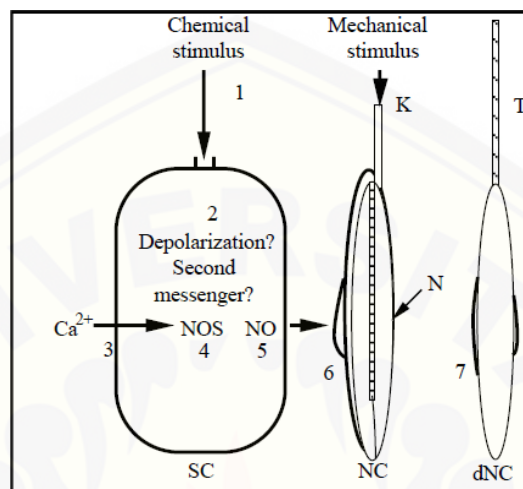
cnidaria. Pada nematosista yang telah diisolasi, kalsium berperan dalam mekanisme *firing* tubul melalui dua cara. Cara pertama akibat berkurangnya jumlah ikatan antara Ca^{2+} dengan polipeptida sehingga membentuk *low molecular weight* polipeptida, menyebabkan influks air, dan meningkatkan tekanan osmotik internal atau tekanan osmotik intrakapsular. Cara kedua ialah akibat berkurangnya ikatan Ca^{2+} yang menyebabkan ketidakstabilan pada operkulum kemudian mencetuskan *firing* tubul nematosista (Gambar 2.6). Kalsium berfungsi untuk membentuk kompleks yang terkoordinasi dengan polipeptida intrakapsular, sehingga dapat mengurangi tekanan osmotik intrakapsular (Novak *et al.*, 1993; Morabito *et al.*, 2013). Jadi, Ca^{2+} dapat menjaga homeostasis tekanan osmotik intrakapsular pada nematosista yang telah diisolasi. Namun, keberadaan Ca^{2+} memiliki efek yang berkebalikan pada nematosista *in situ* atau nematosista yang tidak diisolasi (Salleo *et al.*, 1996).



Gambar 2.6 Mekanisme *firing* tubul nematosista yang diisolasi (Sumber: Novak *et al.*, 1993)

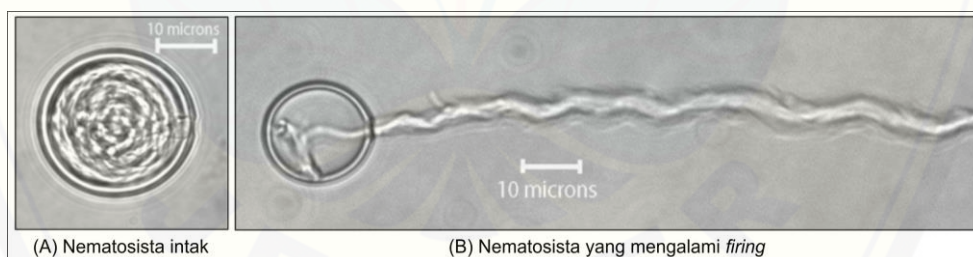
Pada nematosista yang tidak diisolasi atau nematosista *in situ*, influks Ca^{2+} ke dalam cnidosit atau lebih tepatnya *cnidocyt supporting cell complex* (SC) akan mengaktivasi *nitric oxide synthase* (NOS) untuk menghasilkan oksida nitrit (NO). NO akan berikatan dengan reseptor silia atau cnidocil di membran nematosista. Ikatan antara NO dengan cnidocil termasuk dalam jalur rangsang mekanik yang dapat meningkatkan tekanan hidrostatis intrakapsular lebih dari 150 atm,

mendorong operkulum terbuka, dan mengakibatkan *firing* tubul (Gambar 2.7) dalam waktu 3 mili detik, kecepatan tenaga 40.000 g, serta kekuatan penetrasi sebesar 20-33 kPa dengan kedalaman 0,9 mm menembus lapisan dermis manusia (Salleo *et al.*, 1996; Auerbach, 2011).



Gambar 2.7 Mekanisme *firing* tubul nematosista *in situ* atau yang tidak diisolasi (Sumber: Salleo *et al.*, 1996)

Berikut perbedaan gambaran antara nematosista intact dengan nematosista yang mengalami *firing* dapat diamati pada Gambar 2.8.

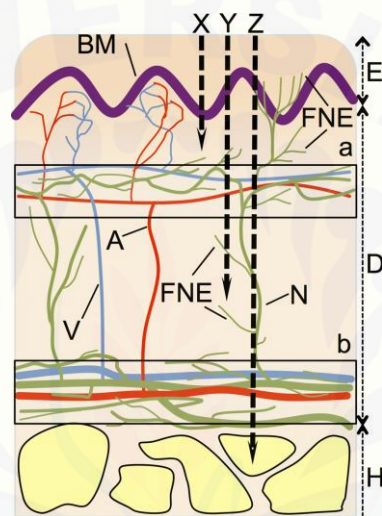


Gambar 2.8 Perbedaan gambaran mikroskopik antara nematosista intact dengan nematosista yang mengalami *firing* (Sumber: Oppegard *et al.*, 2009)

2.3 Kandungan dan Efek Envenomasi Racun *Physalia utriculus* terhadap Fisiologi Tubuh Manusia

Envenomasi racun ubur-ubur terjadi akibat penetrasi tubul per kutan maupun intravaskular. Nematocista yang dilengkapi tubul berukuran panjang memungkinkan racun mencapai lapisan-lapisan integumen (Gambar 2.9) sehingga menyebabkan rasa sakit yang persisten, reaksi inflamasi, dan pelbagai gejala

lainnya. Penetrasi tubul pada lapisan epidermis (kedalaman $\pm 200 \mu\text{m}$) dapat mengenai ujung saraf bebas, yaitu nosiseptor $A\delta$ dan C sehingga memediasi rangsang nyeri. Lebih dari itu, apabila mengenai lapisan dermis atau bahkan hingga lapisan adiposa (kedalaman $\pm 200\text{-}600 \mu\text{m}$ s.d $>600 \mu\text{m}$) dapat menyebabkan toksinemia yang kemudian berpotensi terjadi hemolisis, rusaknya kontinuitas sel membran jaringan lain, dan gangguan sistem kardiovaskular (Calton *et al.*, 1978; Hessinger dan Lenhoff, 1988; Alam dan Qasim. 1991; Kitatani *et al.*, 2015).



E) epidermis, D) dermis, H) hipodermis, A) arteri, V) vena, N) serabut saraf, BM) membran basal, FNE) ujung saraf bebas (nosiseptor $A\delta$ dan C), X) nematosista dengan panjang tubul $200 \mu\text{m}$, Y) nematosista dengan panjang tubul $200\text{-}600 \mu\text{m}$, Z) nematosista dengan panjang tubul $>600 \mu\text{m}$. Kotak a) terdiri *subepidermal nerve plexus*, *subpapillary plexus*, arteri, dan vena, sedangkan kotak b) terdiri *dermal nerve plexus*, *subcutaneous plexus*, arteri, dan vena.

Gambar 2.9 Penetrasi tubul nematosista pada sistem integumen (Sumber: Kitatani *et al.*, 2015)

Berdasar Calton *et al.* (1978) dan Hessinger dan Lenhoff (1988), kandungan racun spesies *Physalia* sebagai berikut:

a. *Kinin-like substances*

Kinin-like substances memiliki persamaan dengan sistem kinin-kalikrein. *Kinin-like substances* menyebabkan terbentuknya bradikinin, aktivasi sistem komplemen, meningkatkan permeabilitas vaskular, dan memicu terjadinya oedema. Gejala pertama pasca envenomasi intrakutan

yang dicetuskan oleh senyawa tersebut meliputi nyeri kutaneus yang disertai rasa terbakar serta eritema.

b. ATPase dan AMPase

Kandungan ATPase dan AMPase dalam racun dapat mengganggu transport ion Ca^{2+} dengan memblokir impuls *neuromuscular junction*. Tidak hanya neurotoksik, racun ini juga bersifat kardiotoxik dibuktikan dengan gambaran EKG abnormal berupa PR interval pendek. ATPase dan AMPase juga menyebabkan influks ion K^+ menuju ekstraselular sehingga terjadi peningkatan frekuensi denyut jantung.

c. *Cytolysins* (*catalytic* dan *stoichiometric*)

Cytolysins bekerja memengaruhi permeabilitas suatu membran sel yang dapat menyebabkan sitolisis, salah satunya ialah hemolisis sel darah merah. Terdapat dua jenis *cytolysins* berdasar perbedaan mekanismenya, yaitu *catalytic* dan *stoichiometric*. *Catalytic cytolysins* atau *catalysins* berperan dalam menghidrolisis fosfolipid suatu membran sel sedangkan *stoichiometric cytolysins* membentuk pori-pori pada membran. Keduanya mengganggu integritas suatu sel.

d. *Physalitoxin*

Physalitoxin (PTX) merupakan zat hemolitik berjumlah sekitar 25% dari kandungan racun spesies *Physalia*. PTX berinteraksi dengan protein integral membran sel darah merah sehingga menyebabkan hemolisis.

2.4 Kakao (*Theoroma cacao* L.)

2.4.1 Taksonomi

Theobroma cacao L. atau lebih dikenal sebagai tanaman kakao, termasuk dalam suku *Sterculaceae*. Kakao merupakan tumbuhan tropis berasal dari Amerika Latin yang dapat tumbuh hingga 10 meter (Winarsih, 2002). Menurut Tjitrosoepomo (1988) sistematika tanaman kakao sebagai berikut:

Kingdom: Plantae

Divisi: Spermatophyta

Subdivisi: Angiospermae

Kelas: Dicotyledoneae

Subkelas: Dialypetalae

Ordo: Malvales

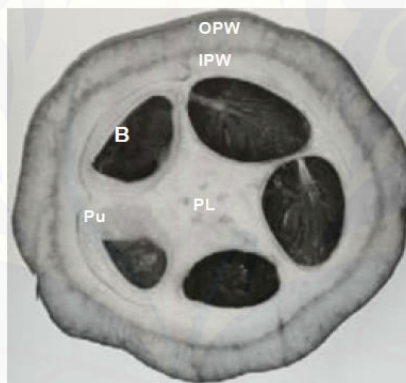
Famili: Sterculiaceae

Genus: *Theobroma*

Spesies: *Theobroma cacao* L.

2.4.2 Morfologi

Buah kakao apabila dibelah akan tampak seperti Gambar 2.10 dan bagian-bagiannya dapat dikarakterisasi, yaitu *outer pod wall* (OPW) sebagai bagian terluar kulit kakao, *inner pod wall* (IPW) atau lapisan kulit yang berada di dalam buah, *pulp* (Pu) atau daging buah kakao, *beans* (B) atau biji kakao, dan *placenta* (PL) sebagai bagian tengah dari buah kakao (Chaidamsari, 2005).



Gambar 2.10 Anatomi buah kakao potongan melintang (Sumber: Chaidamsari, 2005)

2.4.3 Kandungan Fitokimia Biji Kakao dan Produk Olahan Kakao

Konsentrasi fitokimia buah kakao dapat bervariasi tergantung pada varietas, kondisi lingkungan, dan tata cara pengolahannya. Konsentrasi fitokimia buah kakao secara nyata dapat menurun selama proses pengolahan menjadi produk akhir. Rasio kandungan fitokimia yang ditemukan di dalamnya tidak mungkin sama persis dengan yang ditemukan dalam produk akhir. Biji kakao memiliki persentase kandungan fitokimia yang lebih melimpah apabila dibandingkan dengan kulit kakao (Tabel 2.1) dan beberapa senyawa mengalami penurunan konsentrasi ketika telah menjadi bubuk kakao (Tabel 2.2).

Tabel 2.1 Perbandingan komposisi fitokimia antara biji kakao dengan kulit kakao

Komponen	Biji Kakao (%)	Kulit Kakao (%)
Kadar air	5,0	4,5
Lemak	54,0	1,5
<i>Methylxanthine</i>		
Kafein	0,2	
Theobromin	1,2	1,4
Polifenol	6,0	
Protein kasar	11,5	10,9
Mono- dan oligosakarida	1,0	0,1
Pati	6,0	
Pentosa	1,5	7,0
Selulosa	9,0	26,5
Asam Karboksilat	1,5	
Abu	2,6	8,0
Komponen lain	0,5	

Sumber: Belitz dan Grosch, 1999

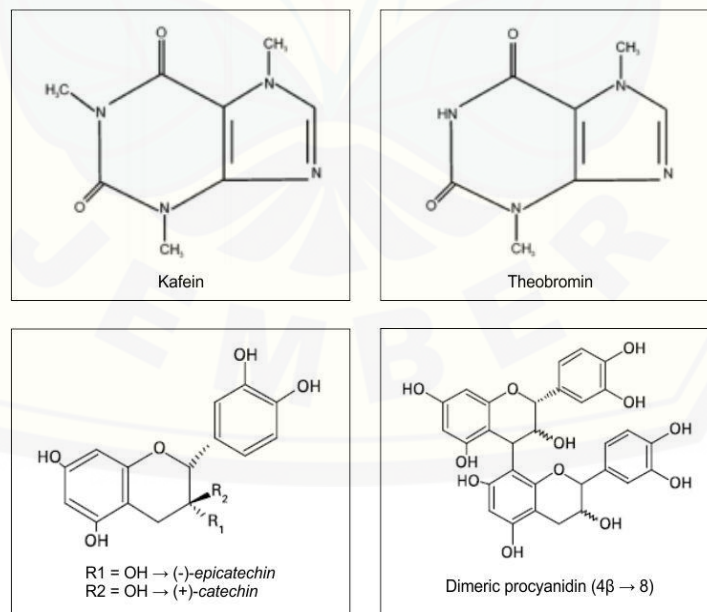
Tabel 2.2 Perbandingan kandungan fitokimia antara biji kakao dengan produk olahan biji kakao

	Biji Kakao (mg/g)	Bubuk Kakao (mg/g)	Coklat (mg/g)
Procyanidin		18,35-27,75	1,081-85,36
(-)-Epicatechin	1,24-16,52	0,116-6,778	0,023-2,270
Catechins	0,05-0,46	0,081-0,896	0,006-0,992
Epicatechin gallate			0,005-0,006
Catechins gallate			0,077-0,094
Epigallocatechin			0,032-0,119
Gallocatechin			0,164-0,231
Epigallocatechin gallate			0,437-0,462
Theobromine	11,1-24,0	15,2-25,0	1,20-6,67
Caffeine	2,0-2,9	0,907-2,5	0,170-0,778

Sumber: Kim *et al.*, 2014

Proses pengolahan biji kakao menjadi bubuk kakao, bungkil kakao, atau serbuk simplisia kakao terdiri atas fermentasi, pencucian, penyangraian, pengupasan, penggilingan, pengempaan, dan penghalusan. Tujuan pengolahan biji kakao menjadi bubuk, yaitu untuk meningkatkan mutu dan daya guna dalam industri makanan, minuman, maupun obat-obatan. Meskipun beberapa senyawa kimia mengalami penurunan konsentrasi pasca pengolahan, tetapi dengan terjadinya perubahan bentuk menjadi bubuk maka akan memudahkan metode penyarian sehingga zat aktif mudah larut dalam cairan penyari.

Menurut Cooper *et al.* (2008), sebesar 72-87% partikel non-lemak berbentuk padat atau *non-fat cocoa solid* (NFCS) terkandung dalam bubuk kakao. Keberadaan NFCS merupakan parameter yang baik untuk mengetahui berbagai komponen bioaktif di dalam bubuk kakao. Kandungan kimia dalam bubuk atau serbuk simplisia biji kakao menurut Kim *et al.* (2014), yaitu *procyanidins* (18,35-27,75 mg/g), theobromin (15,2-25 mg/g), kafein (0,907-2,5 mg/g), (–)-*epicatechin* (0,116-6,778 mg/g), dan *catechins* (0,081-0,896 mg/g). Kandungan fitokimia bubuk kakao secara garis besar terdiri atas *methylxanthines* dan polifenol yang meliputi golongan *flavonoid phenols* dan *nonflavonoid phenols*. Komposisi fitokimia yang dominan terkandung di dalamnya, yaitu *flavonoid phenols* (*procyanidins*, (–)-*epicatechin*, *catechins*) serta *methylxanthines* (theobromin dan kafein) (Tabel 2.2 dan Tabel 2.3). Gugus kelima senyawa dominan tersebut dapat dilihat pada Gambar 2.11. Tidak hanya mengandung *methylxanthines* dan polifenol, bubuk kakao juga mengandung beberapa komponen mineral berupa kalsium (Ca^{2+}), seng (Zn), dan kobalt (Co) serta asam organik berupa asam asetat, asam sitrat, dan asam oksalat (Kim *et al.*, 2014; Ieggli *et al.*, 2011; Cinquanta *et al.*, 2016; Belitz dan Grosch, 1999).



Gambar 2.11 Struktur kimia *procyanidins*, (–)-*epicatechin*, *catechins*, kafein, dan theobromin (Sumber: Jalil dan Ismail, 2008; Puig dan Castell, 2009)

Tabel 2.3 Fitokimia biji kakao dan pembagian kelas senyawa yang terkandung

<i>Flavonoid phenols</i>	
<i>Flavanols</i> atau <i>flavan-3-ols</i>	(-)- Epicatechin (-)- Catechin (+)- Catechin (-)- <i>Epicatechin-3-O-gallate</i> (+)- <i>Gallocatechin</i> (-)- <i>Epigallocatechin</i> Procyanidin B1 (epicatechin-(4β→8)-catechin) Procyanidin B2 (epicatechin-(4β→8)-epicatechin) Procyanidin B2 -O-gallate (epicatechin-3-O-gallate-(4β→8)-epicatechin) Procyanidin B2 -3,3-di-O-gallate (epicatechin-3-O-gallate-(4β→8)-epicatechin-3-O-gallate) Procyanidin B3 (catechin-(4α→8)-catechin) Procyanidin B4 (catechin-(4α→8)-epicatechin) Procyanidin B4-3-O-gallate (catechin-(4β→8)-epicatechin-3-O-gallate) Procyanidin C1 (epicatechin-(4β→8)-epicatechin-(4β→8)-epicatechin) Procyanidin D (epicatechin-(4β→8)-epicatechin-(4β→8)-epicatechin-(4β→8)-epicatechin)
<i>Anthocyanins</i>	<i>3-α-L-Arabinosidyl cyaniding</i> <i>3-β-D-Galactosidyl cyaniding</i>
<i>Flavonols</i>	<i>Quercetin</i> <i>Quercetin-3-O-arabinoside</i> <i>Quercetin-3-O-galactoside</i> <i>Isoquercetin (quercetin-3-O-glucoside)</i>
<i>Flavones</i> atau <i>Isoflavones</i>	<i>Luteolin</i> <i>Luteolin-7-O-hyperoside</i> <i>Orientin</i> <i>Iso-orientin</i> <i>Vitexin</i> <i>Isovitexin</i>
<i>Flavanones</i>	<i>Naringenin</i> <i>Naringenin-7-O-glucoside</i>
<i>Nonflavonoid phenols</i>	
<i>Phenolic acids</i>	<i>Chlorogenic acid</i> <i>Vanillic acid</i> <i>Coumaric acid</i> <i>Phloretic acid</i> <i>Caffeic acid</i> <i>Ferulic acid</i> <i>Phenylacetic acid</i> <i>Syringic acid</i>
Lainnya	<i>Resveratrol</i> <i>Piceid</i> <i>Clovamide</i> <i>Deoxyclovamide</i> <i>Dideoxyclovamide</i>
<i>Methylxanthines</i>	
Theobromin Kafein	

Huruf tebal menandakan konsentrasi yang lebih dominan dibandingkan dengan senyawa lainnya.

Sumber: Kim *et al.*, 2014

Efek terapi yang diinginkan dapat timbul akibat sinergisme langsung maupun tak langsung antar komponen-komponen bioaktif pada buah, biji, maupun bubuk kakao (Jalil dan Ismail, 2008). Berikut manfaat dari senyawa yang terkandung dalam bubuk kakao.

a. Polifenol

Ekstrak etanol biji kakao salah satunya mengandung senyawa polifenol. Polifenol merupakan metabolit sekunder, yaitu hasil metabolit yang keberadaannya tidak dimanfaatkan dalam proses fotosintesis, tetapi dimanfaatkan sebagai sistem pertahanan tumbuhan (Daayf dan Lattanzio, 2008). Polifenol diproduksi oleh sel pigmen kotiledon biji kakao. Senyawa kimia polifenol terbanyak dalam biji kakao ialah golongan *flavonoid phenols* meliputi (–)-*epicatechin* (1,24-16,52 mg/g) dan *catechins* (0,05-0,46 mg/g). Pasca pengolahan menjadi bubuk, senyawa (–)-*epicatechin* mengalami penurunan konsentrasi (0,116-6,778 mg/g), tetapi pada beberapa senyawa ditemukan mengalami peningkatan konsentrasi seperti *catechins* (0,081-0,896 mg/g) dan *procyanidins* (18,35-27,75 mg/g) (Kim *et al.*, 2014).

Polifenol bersifat sebagai agen antioksidan, antiinflamasi, dan juga memiliki peran sitoproteksi (Andujar *et al.*, 2012; Oteiza *et al.*, 2005; Engel *et al.*, 2002). Efek antioksidan dan sitoproteksi senyawa turunan polifenol dapat memengaruhi mekanisme *firing* tubul nematosista. Efek antioksidan bekerja dengan menurunkan produksi oksida nitrit (NO) sehingga menyebabkan semakin sedikit NO yang berikatan dengan reseptor silia atau cnidocil di permukaan membran nematosista. Senyawa (–)-*epicatechin*, *catechins*, dan *procyanidins* dalam ekstrak etanol biji kakao juga dapat berikatan dengan *nematocyst outer wall antigen* (NOWA) (materi penyusun dinding luar) sehingga memberikan efek sitoproteksi terhadap nematosista dari stimulus luar yang bersifat destruktif (Tarahovsky *et al.*, 2008; Oteiza *et al.*, 2005; Engel *et al.*, 2002).

b. *Methylxanthines*

Kakao dan produk kakao tidak hanya kaya akan polifenol, tetapi juga kaya akan *methylxanthines*. *Methylxanthines* merupakan metabolit sekunder

suatu tumbuhan seperti halnya polifenol. *Methylxanthines* terdiri atas kafein (1,3,7-trimethylxanthine) dan senyawa turunan kafein, theobromin (3,7-dimethylxanthine). Pada biji kakao, kandungan theobromin sebesar 11,1-24 mg/g dan mengalami peningkatan menjadi 15,2-25 mg/g setelah diolah, sedangkan kafein mengalami penurunan dari 2-2,9 mg/g menjadi 0,907-2,5 mg/g. Kafein memiliki efek bronkodilator, kardiotonik, dan diuretik. Kafein maupun theobromin dapat meningkatkan konsentrasi norepinefrin dan epinefrin dalam plasma sehingga menimbulkan efek termogenik. Theobromin juga dapat meningkatkan kadar *high density lipoproteins* (HDL) yang bagus untuk kesehatan (Baggott *et al.*, 2013; Franco *et al.*, 2013; Neufingerl *et al.*, 2013; Pinilla *et al.*, 2015, Astrup *et al.*, 1990). Namun, berdasar jurnal-jurnal ilmiah yang ada, belum ditemukan keterkaitan antara efek senyawa kafein maupun theobromin terhadap mekanisme *firing* tubul nematosista.

c. Mineral

Biji kakao dan produk olahan kakao mengandung komponen mineral beberapa diantaranya meliputi kalsium (Ca^{2+}) 70,14 mg/100g, seng (Zn) 4,88 mg/100g, dan kobalt (Co) 0,26 mg/kg (Tabel 2.4). Namun, belum ditemukan efek positif terhadap penghambatan *firing* tubul nematosista yang disebabkan oleh komponen mineral tersebut (Morabito *et al.*, 2014).

Tabel 2.4 Rata-rata kandungan mineral biji kakao dan produk olahan biji kakao dalam mg/100 g

Nutrient	Dark Chocolate 60%	Dark Chocolate 70%	Dark Chocolate 90%	Cocoa Beans
Ca	64.33 ± 1.01	79.51 ± 8.14	90.83 ± 4.92	70.14 ± 2.97
Zn	2.24 ± 0.08	3.19 ± 1.01	3.52 ± 0.16	4.88 ± 0.33
Co (mg/kg)	0.33 ± 0.03	0.43 ± 0.06	0.58 ± 0.04	0.26 ± 0.06
Cu	1.43 ± 0.04	1.83 ± 0.08	2.02 ± 0.12	3.12 ± 0.26
Fe	9.73 ± 0.02	9.84 ± 0.29	10.89 ± 0.13	3.20 ± 0.09
Na	5.20 ± 0.11	4.20 ± 0.45	3.50 ± 0.53	3.40 ± 0.36
Se	0.08 ± 0.00	0.09 ± 0.02	0.10 ± 0.07	0.07 ± 0.05
Mn	1.65 ± 0.06	1.98 ± 0.11	2.05 ± 0.15	3.01 ± 0.55
P	221.80 ± 7.48	279.90 ± 14.14	396.51 ± 24.76	515.84 ± 37.66
K	465.55 ± 11.22	540.43 ± 30.11	720.11 ± 49.91	720.22 ± 37.35
Mg	158.78 ± 7.33	192.23 ± 16.87	252.21 ± 21.58	290.64 ± 55.15
Al	0.56 ± 0.02	0.77 ± 0.29	1.32 ± 0.02	0.69 ± 0.36

Sumber: Cinquanta *et al.*, 2016

d. Asam Organik

Asam organik yang terkandung dalam ekstrak kakao (1,2-1,6%) terbentuk selama proses fermentasi yang sebagian besar terdiri atas asam asetat (CH_3COOH) 0,19-0,71%, asam sitrat ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) 0,45-0,75%, dan asam oksalat (HOOC-COOH) 0,32-0,50% (Belitz dan Grosch, 1999). Menurut Morabito *et al.* (2014) keasaman dapat mengurangi kemampuan *firing* nematosista dengan cara mengganggu sistem transpor kanal ion membran nematosista. pH rendah juga mengakibatkan nematosista mengalami kolaps sehingga mengurangi kemampuan *firing*nya. Nilai pH biji kakao pada beberapa negara dicantumkan pada Tabel 2.5.

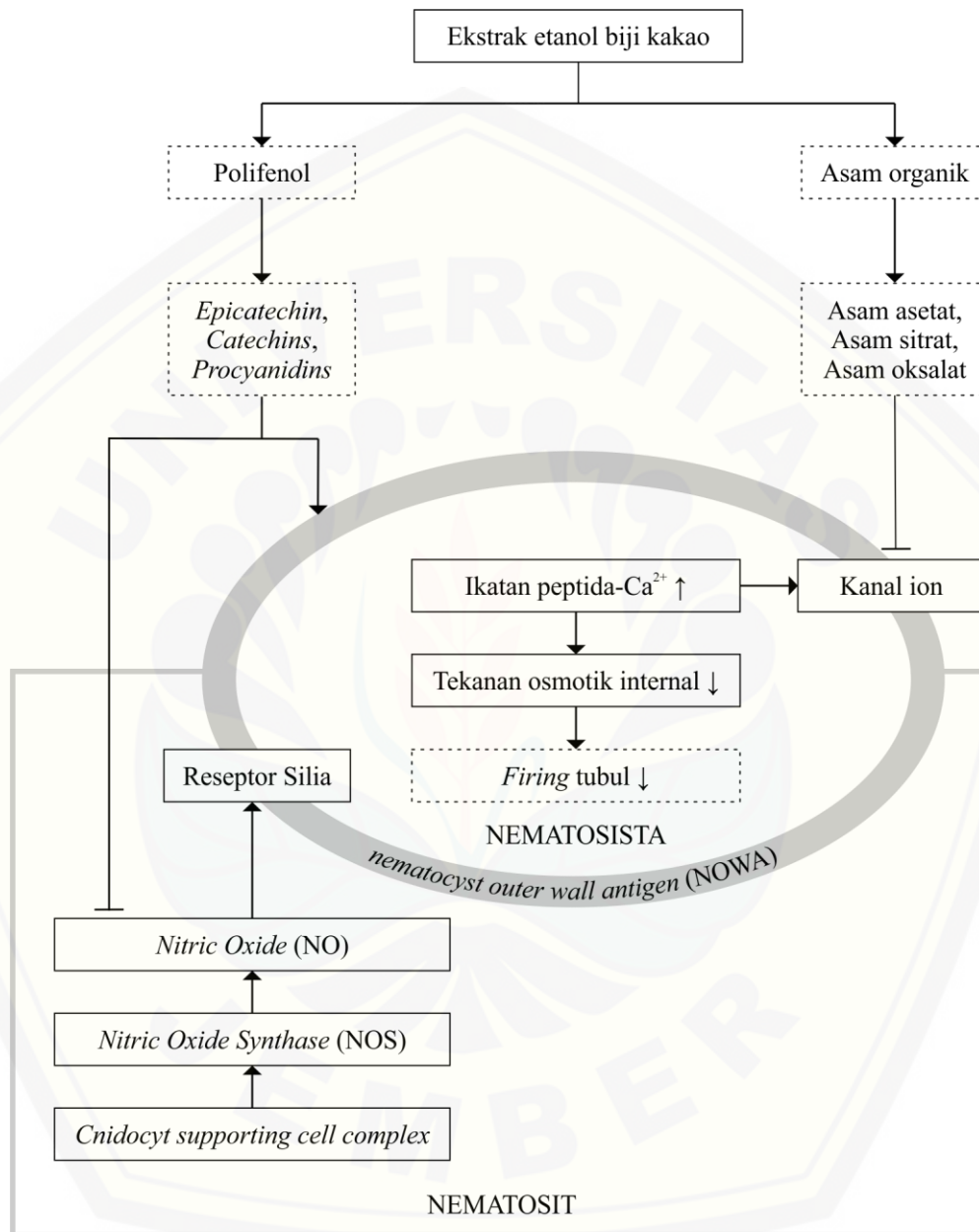
Tabel 2.5 Nilai pH biji kakao pada beberapa negara

Region	pH
Brazil	4.70 ± 0.13
Ecuador	5.59 ± 0.01
Venezuela	5.49 ± 0.07
Guatemala	5.74 ± 0.00
Dominican Republic	25.46 ± 0.65
Gabon	5.48 ± 0.00
Nigeria	5.45 ± 0.01
Cameroon	5.22 ± 0.20
Ghana	5.26 ± 0.13
Ivory Coast	5.32 ± 0.15
Malaysia	4.89 ± 0.36
Indonesia	5.36 ± 0.69
Solomon Island	4.99 ± 0.01

Sumber: Jinap dan Dimick, 1990

2.5 Kerangka Konseptual Penelitian

Skema kerangka konseptual penelitian dapat diamati sebagai berikut.



Keterangan:

□ : Variabel tidak diteliti

□ : Variabel diteliti

—| : Menghambat

→ : Memicu

Gambar 2.12 Kerangka konsep penelitian

Nematosit mengalami dua jenis rangsang, pertama kimia dan kedua mekanik. Rangsang kimia memengaruhi *cnidocyt supporting cell complex*, kemudian dengan bantuan perantara *second messenger* mengaktifasi *nitric oxide synthase* (NOS) untuk menghasilkan oksida nitrit (NO) yang dapat berikatan dengan reseptor silia atau *cnidocil* di membran nematosista. Ikatan NO dan *cnidocil* termasuk dalam jalur rangsang mekanik yang menginduksi peningkatan tekanan osmotik intrakapsular sehingga menyebabkan *firing* tubul nematosista.

Ekstrak etanol biji kakao salah satu diantaranya mengandung senyawa polifenol ((-)-*epicatechin*, *catechins*, dan *procyanidins*) dan asam organik (asam asetat, asam sitrat, dan asam oksalat). Polifenol bersifat sebagai agen antioksidan dan juga memiliki peran sitoproteksi. Efek antioksidan bekerja dengan cara menurunkan produksi NO, sedangkan efek sitoproteksi terjadi akibat ikatan antara senyawa polifenol dengan *nematocyst outer wall antigen* (NOWA) (materi penyusun dinding luar) sehingga dapat melindungi nematosista dari stimulus luar yang bersifat destruktif. Keadaan asam oleh karena kandungan asam organik dalam ekstrak etanol biji kakao dapat menghambat *firing* tubul nematosista dengan cara mengganggu sistem transpor kanal ion membran serta mengakibatkan nematosista kolaps sehingga mengurangi kemampuan *firing*nya.

2.6 Hipotesis Penelitian

Hipotesis pada penelitian ini ialah ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dapat menghambat *firing* tubul nematosista racun ubur-ubur (*Physalia utriculus*) secara *in vitro*.

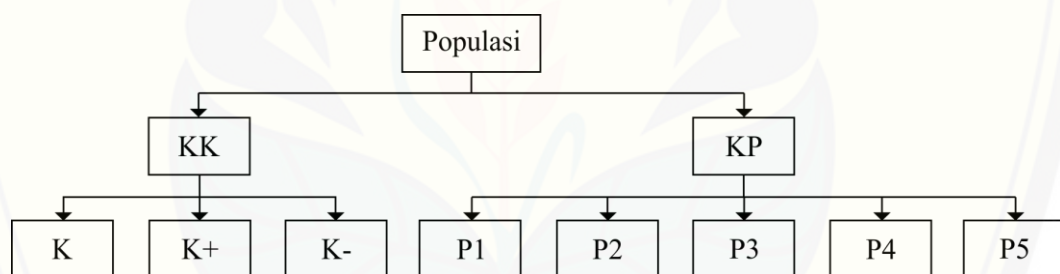
BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan ialah *true experimental design*, yaitu peneliti dapat mengontrol semua variabel luar yang dapat memengaruhi keberlangsungan suatu eksperimen. Desain penelitian eksperimental murni ini dilakukan secara *in vitro*.

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan berupa *post test only control group design*. Penilaian hanya dilakukan saat *post test*, yaitu setelah sampel mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.). Secara sistematis rancangan penelitian dapat diamati pada Gambar 3.1.



Keterangan:

- KK : Kelompok kontrol
- KP : Kelompok perlakuan
- K : Kontrol normal; air laut + 100 mg/ml racun *P. utriculus*
- K+ : Kontrol positif; asam asetat 5% + 100 mg/ml racun *P. utriculus*
- K- : Kontrol negatif; isopropanolol + 100 mg/ml racun *P. utriculus*
- P1 : Perlakuan pertama; ekstrak etanol biji kakao 20% + 100 mg/ml racun *P. utriculus*
- P2 : Perlakuan kedua; ekstrak etanol biji kakao 2% + 100 mg/ml racun *P. utriculus*
- P3 : Perlakuan ketiga; ekstrak etanol biji kakao 0,2% + 100 mg/ml racun *P. utriculus*
- P4 : Perlakuan keempat; ekstrak etanol biji kakao 0,02% + 100 mg/ml racun *P. utriculus*
- P5 : Perlakuan kelima; ekstrak etanol biji kakao 0,002% + 100 mg/ml racun *P. utriculus*

Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1 Populasi Penelitian

Populasi adalah keseluruhan objek yang diteliti. Populasi penelitian ini ialah racun ubur-ubur (*Physalia utriculus*) yang disimpan dalam bentuk kristal di Laboratorium Kimia Fakultas Teknologi Hasil Pangan Politeknik Negeri Jember.

3.3.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini berupa organel subseluler bernama nematosista yang telah diisolasi dari tentakel ubur-ubur.

3.3.3 Besar Sampel Penelitian

Besar sampel diperoleh dari Rumus Federer sebagai berikut.

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(8-1)(r-1) \geq 15$$

$$7(r-1) \geq 15$$

$$(r-1) \geq 15/7$$

$$(r-1) \geq 2,14$$

$$r \geq 3,14$$

Pada rumus tersebut, t merupakan jumlah perlakuan, sedangkan r merupakan banyaknya replikasi atau pengulangan pada setiap kelompok perlakuan. Jumlah sampel minimal yang diperlukan pada penelitian ini dibulatkan menjadi 4 pengulangan pada tiap-tiap kelompok. Berdasar skema rancangan penelitian (Gambar 3.1), terdapat 8 kelompok yang terdiri atas 1 kelompok kontrol positif, 1 kelompok kontrol negatif, 1 kelompok kontrol normal, dan 5 kelompok perlakuan. Sehingga didapatkan jumlah keseluruhan sebanyak 32 sampel penelitian.

3.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di beberapa tempat. Pembuatan ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dan kristal racun *Physalia utriculus* dilakukan di Laboratorium Kimia Fakultas Teknologi Hasil Pangan Politeknik Negeri Jember

sedangkan tempat perlakuan hewan coba dan pengamatan dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Waktu pelaksanaan selama 1 bulan, yaitu pada bulan Januari 2019.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini ialah konsentrasi ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) yang terbagi menjadi 5 konsentrasi berbeda, yaitu 20%, 2%, 0,2%, 0,02%, dan 0,002%.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat penelitian ini ialah jumlah nematosista yang mengalami *firing*.

3.5.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian sebagai berikut.

- Racun dari spesies *Physalia utriculus*
- Konsentrasi racun sebesar 100 mg/ml
- Penelitian dilakukan pada suhu ruang (20-25⁰C)
- Ringer Laktat sebagai pelarut racun
- Aquabides sebagai larutan pengenceran ekstrak biji kakao

3.6 Definisi Operasional

Tujuan dari penentuan definisi operasional ialah untuk membatasi ruang lingkup maupun variabel-variabel yang diteliti dan dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Definisi operasional variabel bebas dan terikat

No.	Variabel	Definisi Operasional	Hasil Ukur	Skala Ukur
1.	Ekstrak etanol biji kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	Ekstraksi biji kakao dilakukan dengan metode maserasi, melarutkan serbuk simplisia biji kakao bermerek "Vicco" dalam cairan penyari etanol 70% sehingga diperoleh ekstrak berkonsentrasi 20%, 2%, 0,2%,	Konsentrasi ekstrak etanol biji kakao 20%, 2%, 0,2%, 0,02%, dan	Rasio

	0,02%, dan 0,002%.	0,002%	
2. Racun ubur-ubur <i>Physalia utriculus</i>	Nematosista yang telah diisolasi dari tentakel ubur-ubur melalui metode autolisis, kemudian dilipolizer menggunakan <i>vacuum freeze dryer</i> untuk membentuk kristal racun atau kristal nematosista, lalu dilarutkan dengan ringer laktat hingga diperoleh konsentrasi 100 mg/ml.	Konsentrasi racun <i>Physalia utriculus</i> 100 mg/ml	Rasio
3. Jumlah <i>firing</i> tubul nematosista	Pengamatan dilakukan dengan mikroskop cahaya (200x) dilengkapi kamera digital, memroses gambar dengan aplikasi AmScope, dan kemudian menghitung persentase antara seluruh nematosista yang <i>firing</i> dengan seluruh nematosista (intak dan <i>firing</i>) yang ditemukan dalam satu preparat tertutup <i>cover slide</i> seluas 9x18 mm ² (Kitatani <i>et al.</i> , 2015; Jouiaei <i>et al.</i> , 2015; Yanagihara <i>et al.</i> , 2016).	Persentase <i>firing</i> tubul nematosista	Rasio

3.7 Alat dan Bahan Penelitian

3.7.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *scalpel*, gunting jaringan, pinset anatomis, *micropipet*, *ependorf*, *micropipet tube*, gelas kimia, spuit 5 ml, *syringe filter* (Minisart), aluminium foil, vortex, almari pendingin, sentrifus (Mega 17R), *object glass*, *cover slide*, neraca analitik digital, mortar, *intverted microscope* (Olympus CKX31), kamera digital (AmScope MU500-HS), dan laptop. Sedangkan alat pelindung diri (APD) yang diperlukan berupa *handscoon*, *googles*, kotak plastik *container*, dan sabun *chlorhexidine gluconate* (CHG).

3.7.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi kristal racun *Physalia utriculus*, aquabides, ringer laktat, isopropanolol, *artificial sea water*, asam asetat 5%, etanol 70%, dan serbuk simplisia biji kakao (*Theobroma cacao* L.) bermerek “Vicco”.

3.8 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian yang dilakukan dibagi menjadi beberapa tahapan yang dimulai dari uji kelayakan etik hingga tahapan percobaan, sebagai berikut.

3.8.1 Uji Kelayakan Etik

Subjek yang digunakan dalam penelitian ini ialah ubur-ubur spesies *Physalia utriculus*, dalam pelaksanaannya memerlukan uji kelayakan etik dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Prosedur ini diharapkan dapat menjamin keamanan peneliti maupun objek yang sedang diteliti, melindungi hak-hak hewan coba, serta memperjelas tujuan dan kewajiban peneliti.

3.8.2 Persiapan Ubur-ubur (*Physalia utriculus*)

Ubur-ubur dibawa ke Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Jember untuk dilakukan identifikasi spesies berdasarkan gambaran morfologi makroskopis (bentuk, panjang dan lebar tubuh, panjang dan jumlah tentakel) dan untuk persiapan proses isolasi racun *Physalia utriculus*.

3.8.3 Proses Isolasi Racun *Physalia utriculus*

Tujuan dilakukan proses pengisolasian racun *Physalia utriculus*, yaitu: (1) kesulitan peneliti dalam menemukan spesies *Physalia utriculus* yang terdampar di sepanjang pesisir pantai, (2) untuk mengurangi kemungkinan envenomasi akibat terkena tentakel ubur-ubur ketika melaksanakan percobaan, (3) supaya dapat disimpan, dan (4) dapat diamati dilain waktu. Proses pengisolasian racun *Physalia utriculus* dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Jember dan Laboratorium Kimia Fakultas Teknologi Hasil Pangan Politeknik Negeri Jember. Tahap pertama pengisolasian racun, yaitu dilakukan pemisahan tentakel dan medusa dari *Physalia utriculus* dengan menggunakan *scalpel*, gunting jaringan, dan pinset anatomis. Selanjutnya tentakel dilarutkan dalam air laut dengan perbandingan 1:5, kemudian disimpan dalam suhu 4°C selama 24 jam agar terjadi autolisis. Setelah 24 jam, campuran tentakel dan air laut tersebut disentrifugasi selama 30 menit dalam suhu 4°C untuk memudahkan

pemisahan antara nematosista dengan tentakel ubur-ubur. Setelah itu mengambil beberapa tetes dari bagian supernatan nematosista untuk dilakukan pengujian mikroskopis menilai keluarnya (*firing*) tubul nematosista. Tabung yang berisi tentakel disimpan kembali dalam almari pendingin pada suhu 4°C selama 24 jam, kemudian setelah 24 jam kembali dilakukan sentrifugasi selama 30 menit, lalu diambil beberapa tetes dari bagian supernatan untuk dilakukan pengujian mikroskopis menilai keluarnya tubul dari nematosista. Prosedur ini dilakukan berulang-ulang hingga hasil dari pemeriksaan mikroskopis menunjukkan sebagian besar nematosista telah terpisah dari tentakelnya. Ekstrak tentakel yang telah dilarutkan dengan air laut tersebut disaring menggunakan kertas saring sebanyak 4 lapis. Setelah disaring, hasil dari saringan akan dilipolizer untuk memisahkan air yang masih berada di dalam nematosista menggunakan *vacuum freeze dryer*.

3.8.4 Pembuatan Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Proses pembuatan ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) menggunakan metode maserasi yang dilaksanakan di Laboratorium Kimia Fakultas Teknologi Hasil Pangan Politeknik Negeri Jember. Bahan yang dipakai dalam pembuatan ekstrak etanol biji kakao diperoleh dari Unit Produksi Aneka *Food* Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia di Jember dalam bentuk serbuk simplisia bermerek “Vicco”. Selama 24 jam sebanyak 1 kg simplisia direndam dalam 5 L cairan penyari etanol 70%, lalu dengan bantuan mesin maserasi kinetik rendaman simplisia tersebut diaduk secara konstan selama 1 jam, kemudian barulah disaring menggunakan kertas saring. Hal tersebut diulang sebanyak 3 kali hingga diperoleh filtrat yang diinginkan. Selama 2 jam filtrat dipekatkan dengan *rotary evaporator* untuk memisahkan antara cairan penyari dengan ekstrak biji kakao, kemudian filtrat dipindahkan ke *waterbath* untuk menguapkan sisa pelarut (etanol 70%) selama 4x24 jam hingga diperoleh ekstrak pekat berkonsentrasi 20%. Setelah itu ekstrak 20% diencerkan dengan metode pengenceran seri menggunakan pelarut aquabides hingga didapatkan konsentrasi 2%, 0,2%, 0,02%, dan 0,002%.

3.8.5 Perlakuan dan Pengamatan Kelompok Sampel

- (1) Pada kelompok kontrol normal, 100 mg/ml racun *Physalia utriculus* diberi air laut dengan cara dihomogenisasi dalam perbandingan 1:1; (50:50) μL .
- (2) Pada kelompok kontrol positif, 100 mg/ml racun *Physalia utriculus* diberi asam asetat 5% dengan cara dihomogenisasi dalam perbandingan 1:1; (50:50) μL .
- (3) Pada kelompok kontrol negatif, 100 mg/ml racun *Physalia utriculus* diberi isopropanolol dengan cara dihomogenisasi dalam perbandingan 1:1; (50:50) μL .
- (4) Pada kelompok perlakuan pertama, 100 mg/ml racun *Physalia utriculus* diberi ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) 20% dengan cara dihomogenisasi dalam perbandingan 1:1; (50:50) μL .
- (5) Pada kelompok perlakuan kedua, 100 mg/ml racun *Physalia utriculus* diberi ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) 2% dengan cara dihomogenisasi dalam perbandingan 1:1; (50:50) μL .
- (6) Pada kelompok perlakuan ketiga, 100 mg/ml racun *Physalia utriculus* diberi ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) 0,2% dengan cara dihomogenisasi dalam perbandingan 1:1; (50:50) μL .
- (7) Pada kelompok perlakuan keempat, 100 mg/ml racun *Physalia utriculus* diberi ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) 0,02% dengan cara dihomogenisasi dalam perbandingan 1:1; (50:50) μL .
- (8) Pada kelompok perlakuan kelima, 100 mg/ml racun *Physalia utriculus* diberi ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) 0,002% dengan cara dihomogenisasi dalam perbandingan 1:1; (50:50) μL .

Masing-masing sampel dihomogenisasi menggunakan vortex selama ± 10 detik. Semua sampel dikondisikan dalam suhu ruang. Setelah itu sampel ditetaskan pada *object glass*, 15 μL per replikasi dari total 100 μL hasil campuran dua larutan yang berbeda di atas, kemudian ditutup dengan *cover slide* 18x18 mm^2 . Pada pengamatan ini menggunakan lapang pandang seluas 9x18 mm^2 dari total luas *cover slide*. Sampel diamati menggunakan mikroskop cahaya (Olympus

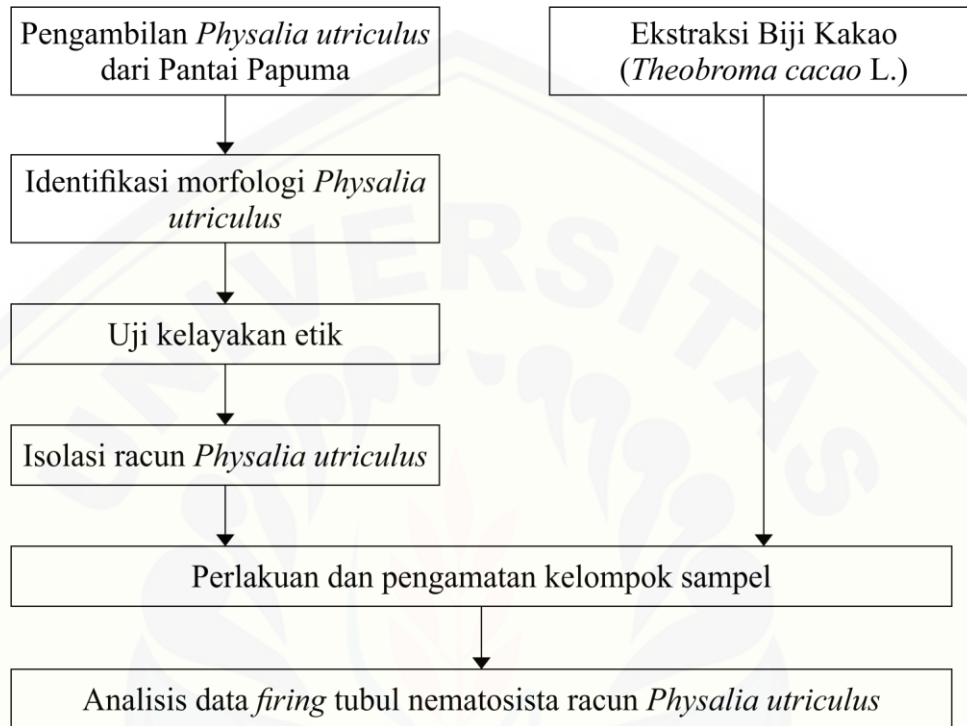
CKX31, perbesaran 200x) yang dilengkapi kamera digital (AmScope MU500-HS) pada bagian lensa okulernya. Jumlah nematosista yang mengalami *firing* dihitung dengan memasukkan gambar yang telah dikalibrasi pada aplikasi AmScope (Kitatani *et al.*, 2015; Jouiaei *et al.*, 2015; Yanagihara *et al.*, 2016). Teknik pengumpulan data dilakukan secara eksperimental laboratoris. Nilai rata-rata diperoleh dari hasil penghitungan persentase *firing* tubul nematosista dari 100 mg/ml racun *Physalia utriculus*.

3.9 Analisis Data

Pada penelitian ini secara keseluruhan terdapat 32 sampel. Uji hipotesis yang digunakan ialah uji komparatif numerik tidak berpasangan. Data dianalisis dengan uji *Shapiro-Wilk* untuk uji normalitas dan *Levene's test* untuk uji homogenitas. Jika sebaran data normal dan data varian sama ($p > 0,05$), analisis data yang digunakan ialah *One Way Anova* dengan *Post Hoc Bonferroni*. Apabila sebaran data normal, tetapi data varian berbeda, maka menggunakan *One Way Anova* dengan *Post Hoc Tamhane's*. Namun, jika sebaran tidak normal dan data varian berbeda ($p < 0,05$) digunakan uji *Kruskal-Wallis* dengan *Post Hoc Mann-Whitney*. Uji tersebut dilakukan untuk menentukan perbedaan yang bermakna dalam setiap kelompok. Perbedaan tiap kelompok dinilai bermakna atau signifikan apabila bernilai $p < 0,05$.

3.10 Alur Penelitian

Alur penelitian ini memiliki beberapa tahapan yang ditampilkan dalam bentuk skema sebagai berikut.



Gambar 3.2 Skema alur penelitian

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari hasil penelitian ini, yaitu:

- a) Pemberian ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dapat menghambat *firing* tubul nematosista racun ubur-ubur (*Physalia utriculus*) secara *in vitro*.
- b) Pemberian ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) konsentrasi 0,2% paling berpotensi menghambat *firing* tubul nematosista racun ubur-ubur (*Physalia utriculus*) secara *in vitro*.

5.2 Saran

Saran-saran yang dapat diberikan dari hasil penelitian ini, yaitu:

- a) Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai komponen fitokimia pada serbuk simplisia biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan proses fraksinasi.
- b) Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai pemanfaatan biji kakao yang diolah tanpa melalui proses fermentasi sehingga beberapa senyawa tetap terjaga konsentrasi kandungannya.
- c) Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai panjang *firing* tubul nematosista racun *Physalia utriculus* menggunakan media *Tentacle Blood Agarose Assay* (TBAS) supaya dapat mengetahui tingkat keparahan dan pengaruh sengatan ubur-ubur (*Physalia utriculus*) terhadap sistemik manusia.

DAFTAR PUSTAKA

- Alam, J. M. dan R. Qasim. 1991. Toxicology of *Physalia's* (Portugese man-o-war) Venom. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 4(2): 159–168.
- Andujar, I., M. C. Recio, R. M. Giner, dan J. L. Rios. 2012. Cocoa Polyphenols and Their Potential Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2012: 1–23.
- Auerbach, P. S. 2011. *Envenomations by Aquatic Invertebrates*. Dalam *Wilderness Medicine: Expert Consult Premium Edition*, Edisi 6. Editor P. S. Auerbach. Philadelphia: Elsevier.
- Astrup, A., S. Toubro, S. Cannon, P. Hein, L. Breum, dan J. Madsen. 1990. Caffeine: A Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Its Thermogenic, Metabolic, and Cardiovascular Effects in Healthy Volunteers. *The American Journal of Clinical Nutrition* 51(5): 759–767.
- Baggott, M. J., E. Childs, A. B. Hart, E. de Bruin, A. A. Palmer, J. E. Wilkinson, dan H. de Wit. 2013. Psychopharmacology of Theobromine in Healthy Volunteers. *Psychopharmacology* 228(1): 109–118.
- Bais, D. S., G. Jiang, Z. Xu, W. Che, dan L. Xiao. 2017. Envenomation with Skin Manifestations and Treatments. *Toxicol Open Access* 3(3): 132.
- Beckmann, A. dan S. Özbek. 2012. The Nematocyst: A Molecular Map of the Cnidarian Stinging Organelle. *Int. J. Dev. Biol* 56: 577–582.
- Belitz, H. D. dan W. Grosch. 1999. *Food Chemistry*. Edisi 2. New York: Springer.
- Berwald, J. 2017. *Spineless: The Science of Jellyfish and the Art of Growing a Backbone*. New York: Riverhead Books.
- Blanquet, R. 1970. Ionic Effects on Discharge of the Isolated and *In Situ* Nematocysts of the Sea Anemone, *Aiptasia pallida*: a Possible Role of Calcium. *Comp. Biochem. Physiol.* 35: 451–461.
- Boulware, D. R. 2006. A Randomized, Controlled Field Trial for the Prevention of Jellyfish Stings with a Topical Sting Inhibitor. *J Travel Med* 13(3): 166–171.
- Calton, G. J., J. W. Burnett, dan W. Vader. 1978. A Study of the Nematocyst Venoms of the Sea Anemone, *Bolocera Tuediae*. *Toxicon* 16(5): 443–451.

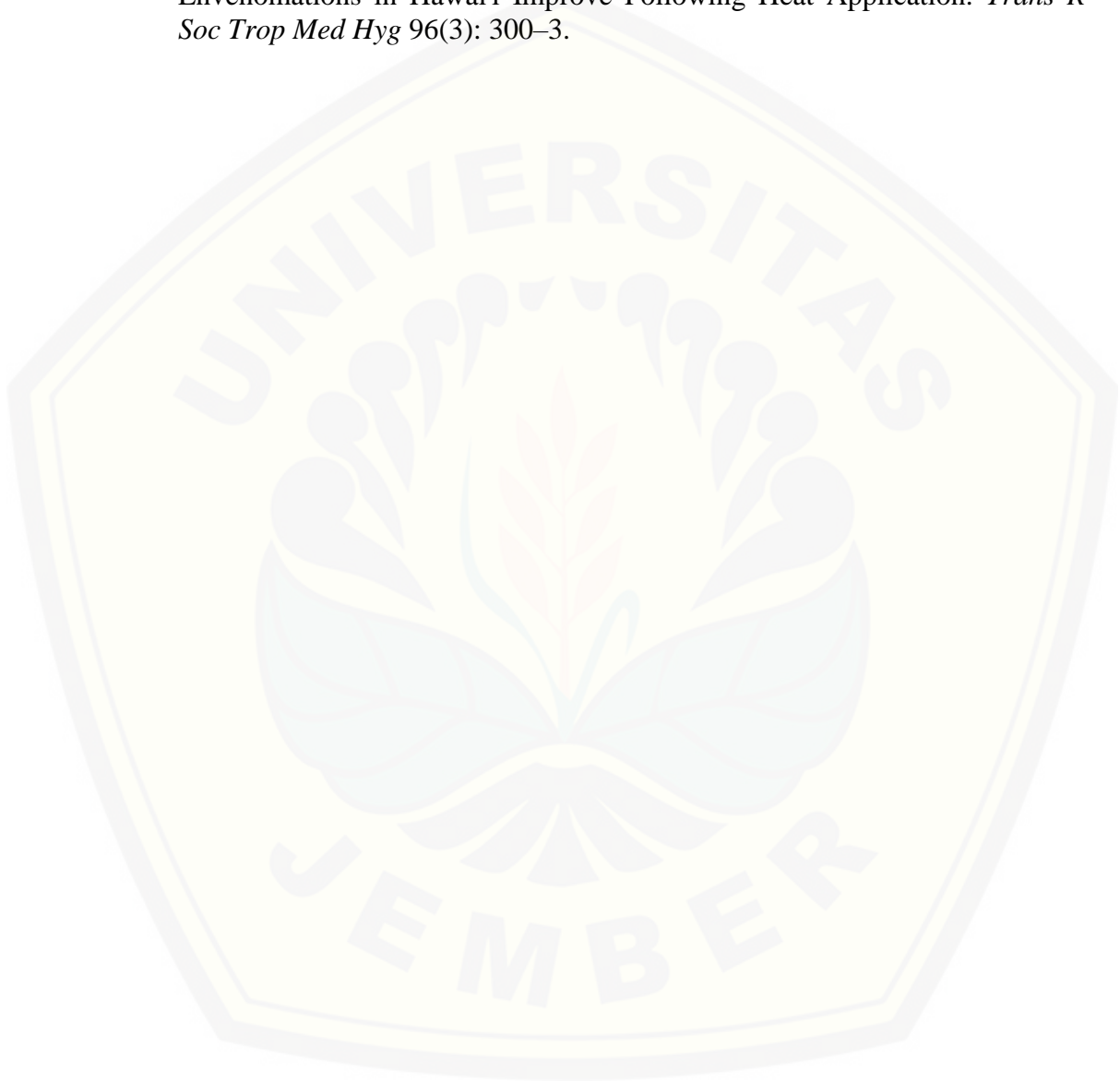
- Cegolon, L., W. Heymann, J. Lange, dan G. Mastrangelo. 2013. Jellyfish Stings and Their Management: A Review. *Marine Drugs* 11(12): 523–550.
- Chaidamsari, T. 2005. *Biotechnology for Cocoa Pod Borer Resistance in Cocoa*. Tesis. Wageningen University.
- Cinquanta, L., C. di Cesare, R. Manoni, A. Piano, P. Roberti, dan G. Salvatori. 2016. Mineral Essential Elements for Nutrition in Different Chocolate Products. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 67(7): 773–778.
- Codes for Australian Aquatic Biota Oceans and Atmosphere. 2013. *Physalia utriculus*. http://www.cmar.csiro.au/data/caab/image_details.cfm?catalog_number=MIIC-02430. [Diakses pada 10 Januari 2019]
- Cooper, K. A., J. L. Donovan, A. L. Waterhouse, dan G. Williamson. 2008. Cocoa and Health: A Decade of Research. *Bri. J. Nutr.* 99: 1–11.
- Daayf, F. dan V. Lattanzio. 2008. *Recent Advances in Polyphenol Research*. Volume 1. United Kingdom: Wiley-Blackwell.
- Duarte, C. M., K. A. Pitt, dan C. H. Lucas. 2014. *Introduction: Understanding Jellyfish Blooms*. Dalam *Jellyfish Blooms*, Edisi 1. Editor K. Pitt dan Lucas C. Dordrecht: Springer.
- Engel, U., S. Oezbek, R. Engel, B. Petri, F. Lottspeich, dan T. W. Holstein. 2002. NOWA, a Novel Protein with Minicollagen Cys-Rich Domains, is Involved in Nematocyst Formation in Hydra. *Journal of Cell Science* 115: 3923–3934.
- Franco, R., A. O. Astibia, dan E. M. Pinilla. 2013. Health Benefits of Methylxanthines in Cacao and Chocolate. *Nutrients* 5(10): 4159–4173.
- Giordano, A. R., L. Vito, dan P. J. Sardella. 2005. Complication of a Portuguese Man-of-War Envenomation to the Foot: A Case Report. *The Journal of Foot and Ankle Surgery* 44(4): 297–300.
- Glaser, O. C. dan Sparrow, C. M. 1909. The physiology of nematocysts. *Journal of Experimental Zoology* 6(3): 361–382.
- Hessinger, D. A. dan H. M. Lenhoff. 1988. *The Biology of Nematocysts*. Edisi 1. Philadelphia: Elsevier.
- Ieggli, C. V. S., D. Bohrer, P. C. do Nascimento, dan L. M. de Carvalho. 2011. Determination of Sodium, Potassium, Calcium, Magnesium, Zinc and

- Iron in Emulsified Chocolate Samples by Flame Atomic Absorption Spectrometry. *Food Chemistry* 124(3): 1189–1193.
- Jalil, A. M. M. dan A. Ismail. 2008. Polyphenols in Cocoa and Cocoa Products: Is There a Link between Antioxidant Properties and Health? *Molecules* 13: 2190–2219.
- Jinap, S. dan Dimick, P. S. 1990. Acidic Characteristics of Fermented and Dried Cocoa Beans from Different Countries of Origin. *Journal of Food Science* 55(2): 547–550.
- Jouiaei, M., N. Casewell, A. Yanagihara, A. Nouwens, B. Cribb, D. Whitehead, dan B. Fry. 2015. Firing the Sting: Chemically Induced Discharge of Cnidae Reveals Novel Proteins and Peptides from Box Jellyfish (*Chironex fleckeri*) Venom. *Toxins* 7(3): 936–950.
- Kim, J., J. Kim, J. Shim, C. Y. Lee, K. W. Lee, dan H. J. Lee. 2014. Cocoa Phytochemicals: Recent Advances in Molecular Mechanisms on Health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 54(11): 1458–1472.
- Kitatani, R., M. Yamada, M. Kamio, dan H. Nagai. 2015. Length is Associated with Pain: Jellyfish with Painful Sting Have Longer Nematocyst Tubules than Harmless Jellyfish. *PLOS ONE* 10(8): e0135015.
- Kurlansky, M. 2004. *Physalia physalis*. http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Physalia_physalis/html. [Diakses pada 20 Oktober 2018]
- Lang, F., M. Ritter, H. Volkl, dan D. Haussinger. 1993. *Cell Volume Regulatory Mechanisms-An Overview*. Dalam *Advances in Comparative and Environmental Physiologi Interaction of Cell Volume and Cell Function*, Edisi 14. Editor R. Gilles, P. J. Butler, R. Greger, Ch. P. Mangum, G. N. Somero, K. Takahashi, dan R. E. Weber. Berlin: Springer.
- Loten, C., B. Stokes, D. Worsley, J. E. Seymour, S. Jiang, dan G. K. Isbister. 2006. A Randomised Controlled Trial of Hot Water (45 Degrees C⁰) Immersion Versus Ice Packs for Pain Relief in Bluebottle Stings. *Med J Aust* 184(7): 329–33.
- Lubbock, R., B. L. Gupra, dan T. A. Hall. 1981. Novel Role of Calcium in Exocytosis: Mechanism of Nematocyst Discharge as Shown by X-Ray Microanalysis. *Cell Biology* 78(6): 3624–3628.
- Lubbock R. dan W. B. Amos. 1981. Removal of Bound Calcium from Nematocyst Contents Causes Discharge. *Nature* 290: 500–501.

- Morabito, R., A. Marino, dan G. La Spada. 2013. Heavy Metals Affect Regulatory Volume Decrease (RVD) in Nematocytes Isolated from the jellyfish *Pelagia noctiluca*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 165(2): 199–206.
- Morabito, R., S. Dossena, G. La Spada, dan A. Marino. 2014. Heavy Metals Affect Nematocysts Discharge Response and Biological Activity of Crude Venom in the Jellyfish *Pelagia noctiluca* (Cnidaria, Scyphozoa). *Cellular Physiology and Biochemistry* 34(2): 244–254.
- Mujiono, N. 2010. Jellyfish Sting: An Indonesian Case Report. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan* 2(1): 1–9.
- Neufingerl, N., Y. E. Zebregs, E. A. Schuring, dan E. A. Trautwein. 2013. Effect of Cocoa and Theobromine Consumption on Serum HDL-Cholesterol Concentrations: A Randomized Controlled Trial. *The American Journal of Clinical Nutrition* 97(6): 1201–1209.
- Novak, I., M. Hidaka, M. Wheatly, J. Balthazart, G. F. J. Ball. 1993. Advances in Comparative and Environmental Physiology: Mechanics of Nematocyst Discharge. Edisi 15. *Springer* 165: 45–76.
- Oteiza, P. I., A. G. Erlejman, S. V. Verstraeten, C. L. Keen, dan C. G. Fraga. 2005. Flavonoid-Membrane Interactions: A Protective Role of Flavonoids at the Membrane Surface? *Clinical & Developmental Immunology* 12(1): 19–25.
- Oppegard, S. C., P. A. Anderson, dan D. T. Eddington. 2009. Puncture Mechanics of Cnidarian Cnidocysts: A Natural Actuator. *Journal of Biological Engineering* 3(1): 17.
- Pinilla, E. M., A. O. Astibia, dan R. Franco. 2015. The Relevance of Theobromine for the Beneficial Effects of Cocoa Consumption. *Frontiers in Pharmacology* 6(30): 1–5.
- Puig, E. R. dan M. Castell. 2009. Cocoa: Antioxidant and Immunomodulator. *British Journal of Nutrition* 101: 931–940.
- Remigante, A., R. Costa, R. Morabito, G. La Spada, A. Marino, dan S. Dossena. 2018. Impact of Scyphozoan Venoms on Human Health and Current First Aid Options for Stings. *Toxins* 10(4): 133.
- Salleo A., G. Musci, P. F. A. Barra, dan L. Calabrese. 1996. The Discharge Mechanism of Acontial Nematocytes Involves the Release of Nitric Oxide. *The Journal of Experimental Biology* 199: 1261–1267.

- Slaughter, R. J., D. M. G. Beasley, B. S. Lambie, dan L. J. Schep. 2009. New Zealand's Venomous Creatures. *The New Zealand Medical Journal* 122(1290): 83–97.
- Tarahovsky, Y. S. 2008. Plant Polyphenols in Cell-Cell Interaction and Communication. *Plant Signaling & Behavior* 3(8): 609–611.
- Tibballs, J., A. A. Yanagihara, H. C. Turner, dan K. Winkel. 2011. Immunological and Toxinological Responses to Jellyfish Stings. *Inflammation & Allergy-Drug Targets* 10: 438–446.
- Tjitrosoepomo, G. 1988. *Taksonomi Tumbuhan (Sperma thopyta)*. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Travagli, V. 2018. Tonicity Calculations: An Aid to Understanding. *Journal of Pharmacy Practice and Education* 1(1): 6.
- Waikiki Aquarium. 2013. *Marine Life Profile: Indo-Pacific Portuguese Man-of-War*. Hawaii: Education Department Waikiki Aquarium University of Hawai'i-Mānoa.
- Whitaker, J. D., R. King, dan D. Knott. 2006. Jellyfish. <http://www.dnr.sc.gov/marine/pub/seascience/jellyfish.html>. [Diakses pada 20 November 2018]
- Wilcox C. L. dan A. A. Yanagihara. 2016. Heated Debates: Hot-Water Immersion or Ice Packs as First Aid for Cnidarian Envenomations? *Toxins (Basel)* 8(4): 97.
- Wilcox, C. L., J. L. Headlam, T. K. Doyle, dan A. A. Yanagihara. 2017. Assessing the Efficacy of First-Aid Measures in *Physalia* sp. Envenomation, Using Solution- and Blood Agarose-Based Models. *Toxins* 9(5): 149.
- Winarsih, S., D. Santoso, dan T. Wardiyati. 2002. Embriogenesis Somatik dan Regenerasi dari Eksplan Embrio Zigotik Kakao (*Theobroma cacao* L.). *Pelita Perkebunan* 18: 99–108.
- World Register of Marine Species. 2018. *Physalia utriculus* (Gmelin, 1788). <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=387269#sources>. [Diakses pada 20 November 2018].
- Yanagihara, A. A., J. M. Y. Kuroiwa, L. M. Oliver, dan D. D. Kunkel. 2002. The Ultrastructure of Nematocysts from the Fishing Tentacle of the Hawaiian Bluebottle, *Physalia utriculus* (Cnidaria, Hydrozoa, Siphonophora). *Hydrobiologia* 489: 139–150.

- Yanagihara, A. A., C. Wilcox, R. King, K. Hurwitz, dan A. Castelfranco. 2016. Experimental Assays to Assess the Efficacy of Vinegar and Other Topical First-Aid Approaches on Cubozoan (*Alatina alata*) Tentacle Firing and Venom Toxicity. *Toxins* 8(1): 1–21.
- Yoshimoto, C. M. dan A. A. Yanagihara. 2002. Cnidarian (Coelenterate) Envenomations in Hawai'i Improve Following Heat Application. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96(3): 300–3.



LAMPIRAN

Lampiran 3.1 Halaman Pertama Lembar *Ethical Clearance*



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 : 1.233/H25.1.11/KE/2019

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 :

POTENSI EKSTRAK ETANOL BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L.) TERHADAP PENGHAMBATAN *FIRING* TUBUL NEMATOSISTA RACUN UBUR-UBUR (*Physalia atriculus*) SECARA *IN VITRO*

Nama Peneliti Utama : Sarwendah Siswi Winasis
Name of the principal investigator

NIM : 152010101040

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Name of institution

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



Jember, 01.03.2019
Ketua Komisi Etik Penelitian

dr. Rini Riyanti, Sp.PK

Lampiran 3.2 Halaman Kedua Lembar *Ethical Clearence***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 :

1. Mohon diperhatikan kontrol kualitas pembuatan ekstrak etanol biji kakao agar didapatkan kadar yang diinginkan.
2. Mohon diperhatikan pembuangan limbah medis dan limbah B3 agar tidak mencemari lingkungan.

Mengetahui
Ketua Komisi Etik Penelitian

dr. Rini Riyanti, Sp.PK

Jember, 25 Februari 2019
Reviewer


dr. Desie Dwi Wisudanti, M.Biomed

Lampiran 3.3 Dokumentasi Kegiatan Penelitian

a) Bahan yang diperlukan dalam penelitian

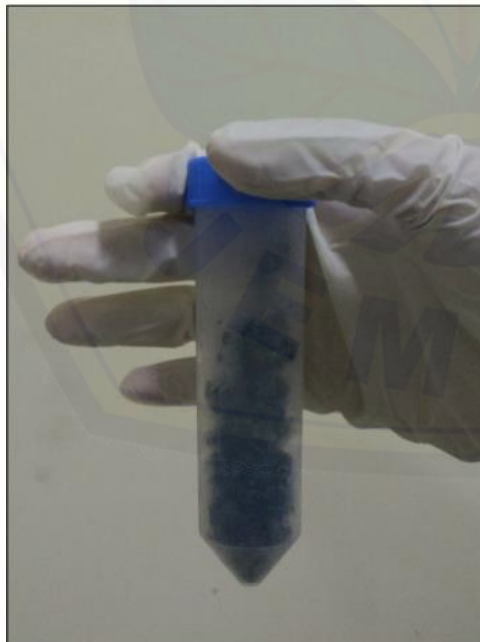
1) Serbuk simplisia biji kakao bermerek “Vicco”



2) Ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.)

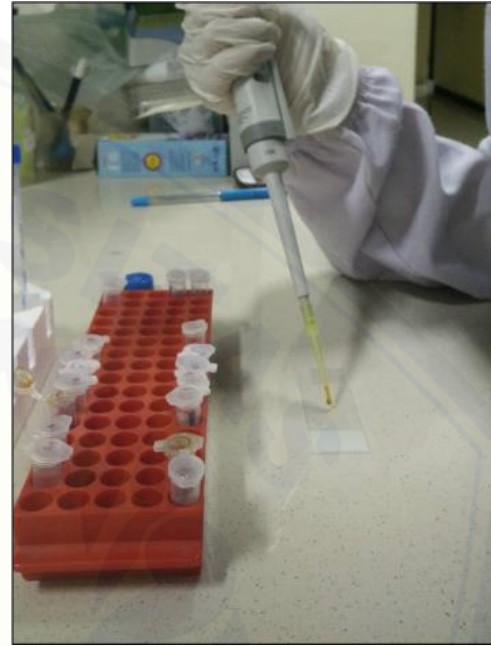


3) Kristal racun *Physalia utriculus*

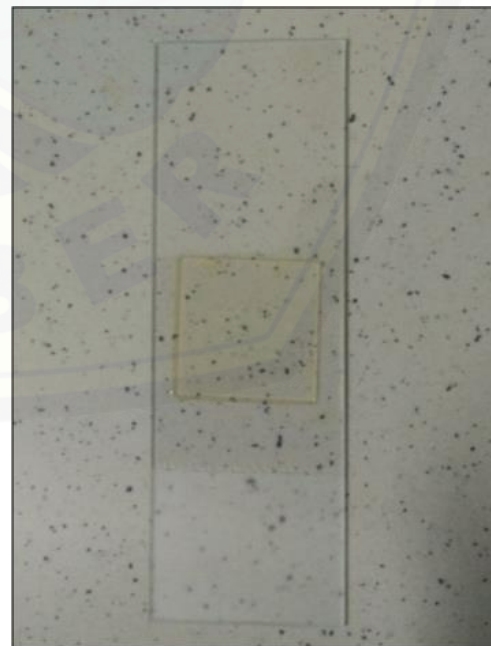
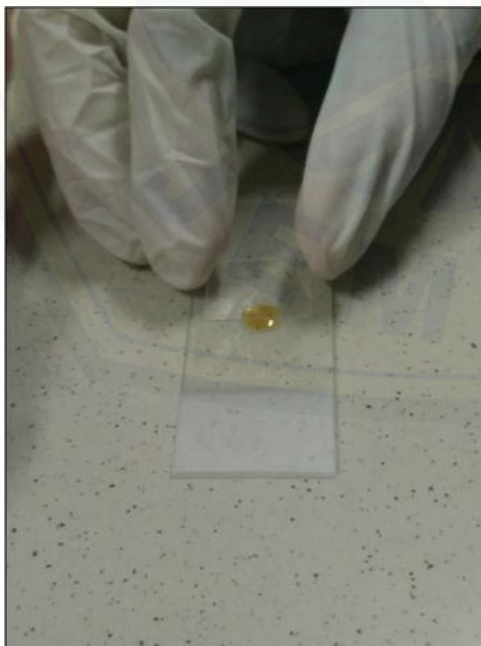


b) Perlakuan dan pengamatan kelompok sampel

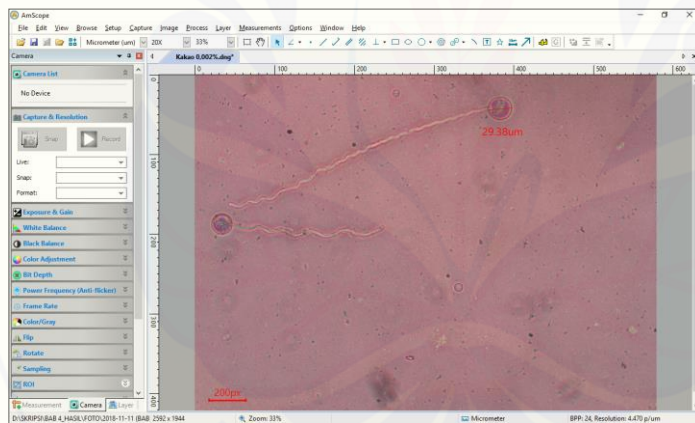
- 1) Pengenceran seri ekstrak etanol biji kakao dan proses pencampuran racun berkonsentrasi 100 mg/ml dengan berbagai larutan perlakuan
- 2) Pengambilan 15 μ L sampel (campuran racun dan berbagai larutan perlakuan) pada *object glass* pasca divortex



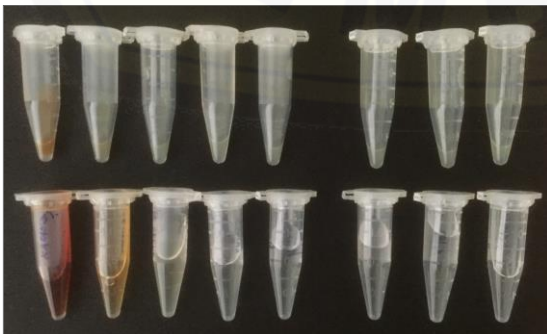
- 3) Menutup *object glass* dengan *cover slide* 18x18 mm²
- 4) Preparat sampel



- 5) Pengamatan kelompok sampel menggunakan aplikasi AmScope



- 6) Penempatan masing-masing 100 μ L sampel (campuran racun dan berbagai larutan perlakuan) dalam wadah *micropipet tube*



Lampiran 3.4 Surat Rekomendasi Bebas Plagiasi**SURAT PERNYATAAN TERBIT JURNAL**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Sarwendah Siswi Winasis

NIM : 152010101040

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa jurnal saya yang berjudul "Potensi Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) Terhadap Penghambatan Firing Tubul Nematosisista Racun Ubur-Ubur (*Physalia utriculus*) Secara *In Vitro*" dalam proses penerbitan dalam *Journal of Agromedicine and Medical Sciences*. 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 di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 27 Januari 2019

Dosen Pembimbing Utama,



dr. Al Munawir, M.Kes, Ph.D
NIP. 19690901 199903 1 003

Yang menyatakan,



Sarwendah Siswi Winasis
NIM. 152010101040

Lampiran 4.1 Data Penelitian

Kelompok	Kode Kelompok	Σ Nematosista		% Firing	Rata-rata \pm Standar Deviasi (%)
		Intak	Firing		
Kontrol Normal (Air laut)	N1	318	283	47.09%	42.50 \pm 3.18
	N2	260	175	40.23%	
	N3	266	181	40.49%	
	N4	252	184	42.20%	
Kontrol Positif (Asam asetat 5%)	K+(1)	206	157	43.25%	37.97 \pm 5.57
	K+(2)	224	150	40.11%	
	K+(3)	282	122	30.20%	
	K+(4)	243	151	38.32%	
Kontrol Negatif (Isopropanolol)	K-(1)	255	237	48.17%	52.44 \pm 2.98
	K-(2)	165	185	52.86%	
	K-(3)	167	204	54.99%	
	K-(4)	166	193	53.76%	
Perlakuan 1 (Kakao 20%)	P1(1)	336	265	44.09%	48.24 \pm 5.37
	P1(2)	280	358	56.11%	
	P1(3)	434	382	46.81%	
	P1(4)	534	454	45.95%	
Perlakuan 2 (Kakao 2%)	P2(1)	525	395	42.93%	40.62 \pm 7.10
	P2(2)	945	410	30.26%	
	P2(3)	426	320	42.90%	
	P2(4)	319	276	46.39%	
Perlakuan 3 (Kakao 0.2%)	P3(1)	258	147	36.30%	29.45 \pm 5.39
	P3(2)	485	204	29.61%	
	P3(3)	574	173	23.16%	
	P3(4)	345	139	28.72%	
Perlakuan 4 (Kakao 0.02%)	P4(1)	705	366	34.17%	37.60 \pm 9.78
	P4(2)	946	398	29.61%	
	P4(3)	260	280	51.85%	
	P4(4)	550	293	34.76%	
Perlakuan 5 (Kakao 0.002%)	P5(1)	290	217	42.80%	41.11 \pm 3.92
	P5(2)	445	249	35.88%	
	P5(3)	373	256	40.70%	
	P5(4)	340	279	45.07%	

Lampiran 4.2 Uji Normalitas dan Homogenitas

Test of Normality

	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
<i>Firing Tubul Nematosista</i>	Kontrol Normal (Air laut)	.288	4	.	.823	4	.151
	Kontrol positif (Asam asetat 5%)	.275	4	.	.924	4	.558
	Kontrol negatif (Isopropanolol)	.305	4	.	.878	4	.329
	Perlakuan 1 (Kakao 20%)	.355	4	.	.817	4	.136
	Perlakuan 2 (Kakao 2%)	.376	4	.	.814	4	.129
	Perlakuan 3 (Kakao 0.2%)	.238	4	.	.968	4	.828
	Perlakuan 4 (Kakao 0.02%)	.364	4	.	.825	4	.156
	Perlakuan 5 (Kakao 0.002%)	.208	4	.	.965	4	.807

a. Lilliefors Significance Correction

*Test of Homogeneity of Variances**Firing Tubul Nematosista*

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Based on Mean	1.027	7	24	.438
Based on Median	.278	7	24	.957
Based on Median and with adjusted df	.278	7	12.641	.952
Based on trimmed mean	.886	7	24	.532

Lampiran 4.3 Uji *One Way Anova*

ANOVA

Firing Tubul Nematosista

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1358.281	7	194.040	5.768	.001
Within Groups	807.401	24	33.642		
Total	2165.682	31			

Lampiran 4.4 Post Hoc Bonferroni

Multiple Comparisons

Dependent Variable: *Firing* Tubul Nematostista
Bonferroni

(I) PERLAKUAN	(J) PERLAKUAN	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Air laut	Asam asetat 5%	4.53250	4.10132	1.000	-9.8739	18.9389
	Isopropanolol	-9.94250	4.10132	.651	-24.3489	4.4639
	Kakao 20%	-5.73750	4.10132	1.000	-20.1439	8.6689
	Kakao 2%	1.88250	4.10132	1.000	-12.5239	16.2889
	Kakao 0.2%	13.05500	4.10132	.112	-1.3514	27.4614
	Kakao 0.02%	4.90500	4.10132	1.000	-9.5014	19.3114
	Kakao 0.002%	1.39000	4.10132	1.000	-13.0164	15.7964
Asam asetat 5%	Air laut	-4.53250	4.10132	1.000	-18.9389	9.8739
	Isopropanolol	-14.47500*	4.10132	.048	-28.8814	-.0686
	Kakao 20%	-10.27000	4.10132	.545	-24.6764	4.1364
	Kakao 2%	-2.65000	4.10132	1.000	-17.0564	11.7564
	Kakao 0.2%	8.52250	4.10132	1.000	-5.8839	22.9289
	Kakao 0.02%	.37250	4.10132	1.000	-14.0339	14.7789
	Kakao 0.002%	-3.14250	4.10132	1.000	-17.5489	11.2639
Isopropanolol	Air laut	9.94250	4.10132	.651	-4.4639	24.3489
	Asam asetat 5%	14.47500*	4.10132	.048	.0686	28.8814
	Kakao 20%	4.20500	4.10132	1.000	-10.2014	18.6114
	Kakao 2%	11.82500	4.10132	.229	-2.5814	26.2314
	Kakao 0.2%	22.99750*	4.10132	.000	8.5911	37.4039
	Kakao 0.02%	14.84750*	4.10132	.038	.4411	29.2539
	Kakao 0.002%	11.33250	4.10132	.303	-3.0739	25.7389
Kakao 20%	Air laut	5.73750	4.10132	1.000	-8.6689	20.1439
	Asam asetat 5%	10.27000	4.10132	.545	-4.1364	24.6764
	Isopropanolol	-4.20500	4.10132	1.000	-18.6114	10.2014
	Kakao 2%	7.62000	4.10132	1.000	-6.7864	22.0264
	Kakao 0.2%	18.79250*	4.10132	.003	4.3861	33.1989
	Kakao 0.02%	10.64250	4.10132	.445	-3.7639	25.0489
	Kakao 0.002%	7.12750	4.10132	1.000	-7.2789	21.5339
Kakao 2%	Air laut	-1.88250	4.10132	1.000	-16.2889	12.5239
	Asam asetat 5%	2.65000	4.10132	1.000	-11.7564	17.0564
	Isopropanolol	-11.82500	4.10132	.229	-26.2314	2.5814
	Kakao 20%	-7.62000	4.10132	1.000	-22.0264	6.7864
	Kakao 0.2%	11.17250	4.10132	.331	-3.2339	25.5789
	Kakao 0.02%	3.02250	4.10132	1.000	-11.3839	17.4289
	Kakao 0.002%	-.49250	4.10132	1.000	-14.8989	13.9139
Kakao 0.2%	Air laut	-13.05500	4.10132	.112	-27.4614	1.3514
	Asam asetat 5%	-8.52250	4.10132	1.000	-22.9289	5.8839
	Isopropanolol	-22.99750*	4.10132	.000	-37.4039	-8.5911
	Kakao 20%	-18.79250*	4.10132	.003	-33.1989	-4.3861
	Kakao 2%	-11.17250	4.10132	.331	-25.5789	3.2339
	Kakao 0.02%	-8.15000	4.10132	1.000	-22.5564	6.2564
	Kakao 0.002%	-11.66500	4.10132	.251	-26.0714	2.7414
Kakao 0.02%	Air laut	-4.90500	4.10132	1.000	-19.3114	9.5014

	Asam asetat 5%	-3.37250	4.10132	1.000	-14.7789	14.0339
	Isopropanolol	-14.84750*	4.10132	.038	-29.2539	-.4411
	Kakao 20%	-10.64250	4.10132	.445	-25.0489	3.7639
	Kakao 2%	-3.02250	4.10132	1.000	-17.4289	11.3839
	Kakao 0.2%	8.15000	4.10132	1.000	-6.2564	22.5564
	Kakao 0.002%	-3.51500	4.10132	1.000	-17.9214	10.8914
Kakao 0.002%	Air laut	-1.39000	4.10132	1.000	-15.7964	13.0164
	Asam asetat 5%	3.14250	4.10132	1.000	-11.2639	17.5489
	Isopropanolol	-11.33250	4.10132	.303	-25.7389	3.0739
	Kakao 20%	-7.12750	4.10132	1.000	-21.5339	7.2789
	Kakao 2%	.49250	4.10132	1.000	-13.9139	14.8989
	Kakao 0.2%	11.66500	4.10132	.251	-2.7414	26.0714
	Kakao 0.02%	3.51500	4.10132	1.000	-10.8914	17.9214

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

