

Potensi Ekstrak Kakao (*Theobroma cacao*) dalam Menghambat Kerusakan Eritrosit yang Diinduksi Racun *Physalia utriculus* In Vitro

Cocoa (*Theobroma cacao*) Extract Potency in Inhibiting Erythrocyte Damage Induced by *Physalia utriculus* Venom

Adinningtyas Intansari¹, Al Munawir², Laksmi Indreswari³

¹Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Jember

²Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Jember

³Laboratorium Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Jember

email korespondensi: adinningtyasintan@gmail.com

Abstrak

Physalia utriculus atau ubur-ubur merupakan salah satu biota laut invertebrata yang sering ditemukan di perairan Indonesia. Kakao (*Theobroma cacao* L.) terutama bijinya mengandung lemak, karbohidrat, protein, dan senyawa polifenol yang berguna sebagai antioksidan. Penelitian ini menggunakan sampel eritrosit berjumlah 28 sampel yang dibagi menjadi tujuh kelompok, yaitu kelompok kontrol positif, kontrol negatif, dan perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol kakao 0,2%, 0,1%, 0,04%, dan 0,02%. Masing-masing kelompok selanjutnya diinduksi racun *Physalia utriculus*. Hasil penelitian didapatkan Rerata kecepatan lisis eritrosit pada kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol kakao 0,2%, 0,1%, 0,04%, dan 0,02% berturut-turut adalah $858,25 \pm 94,44$; $1.000,5 \pm 159,93$; $678,5 \pm 19,71$; dan $1.006 \pm 159,50$ (dalam detik). Rerata kecepatan lisis eritrosit pada kelompok kontrol negatif sebesar 1.025 ± 164.63 detik dan kelompok kontrol positif dengan pemberian *N-Acetylcystein* dapat bertahan hingga lebih dari satu jam setelah pemberian racun (data tidak ditampilkan). Analisis *One Way Annova* menunjukkan nilai signifikansi $p < 0,05$. Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak etanol kakao tidak berpotensi menghambat kerusakan eritrosit yang telah diinduksi racun *Physalia utriculus* secara *in vitro*.

Kata kunci: kakao, kerusakan eritrosit, *Physalia utriculus*

Abstract

Physalia utriculus or jellyfish is one of the invertebrate marine biota that is often found in Indonesia. Cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) contain fat, carbohydrates, proteins, and polyphenol compounds that are useful as antioxidants. The purpose of this study was to determine the potency of cacao (*Theobroma cacao* L.) ethanol extract in inhibiting the damage of erythrocyte induced by *Physalia utriculus* in vitro. This study used 28 samples of erythrocytes divided into seven groups, namely the normal control group, negative controls, and treatment with cocoa ethanol extract 0.2%, 0.1%, 0.04%, and 0.02%. Each subsequent group induced venom *Physalia utriculus*. The results showed that the average speed of erythrocyte lysis in the treatment group by giving cocoa ethanol extract 0.2%, 0.1%, 0.04%, and 0.02% respectively (seconds \pm standard deviation) was $858,25 \pm 94,44$; $1.000,5 \pm 159,93$; $678,5 \pm 19,71$; and $1.006 \pm 159,50$. The mean speed of erythrocyte lysis in the negative control group was $1,025 \pm 164.63$ and the positive control group with the administration of *N-Acetylcystein* can last up to one hour after administration of venoms. Test for normality and homogeneity shows that data is normally distributed and homogeneous. *One Way Annova* analysis shows the significance value of $p < 0.05$. In this study it can be concluded that the administration of cocoa ethanol extract has no potential to inhibit erythrocyte damage that has been venommed by *Physalia utriculus* in vitro.

Keywords: *Physalia utriculus*, cacao, erythrocyte damage

Pendahuluan

Indonesia merupakan negara maritim dengan tiga perempat presentasi wilayahnya berupa laut dengan panjang garis pantai 95.161 km, terpanjang kedua setelah Kanada. Salah satu biota laut yang sering ditemukan ialah ubur-ubur.

Ubur-ubur termasuk ke dalam filum *Coelenterata* yang dapat menyebabkan terjadinya keracunan pada manusia. Spesies ubur-ubur yang sering ditemukan adalah *Physalia utriculus*. Beberapa gejala keracunan akibat sengatan ubur-ubur menyebabkan rasa sakit dan gatal pada kulit serta komplikasi pada jantung dan saraf sebagai gejala sistemik akibat racun yang masuk melalui peredaran darah (Tibbals, 2006). Di Indonesia dilaporkan sebanyak 13 kasus sengatan ubur-ubur pada tahun 2005-2009 dengan tiga orang meninggal akibat sengatan ubur-ubur di daerah Jawa, Bali, dan Bangka (Mujiono, 2010).

Racun *Physalia utriculus* bersifat kardiotoxik, hemolitik, dan dermatonekrotik (Alam dan Qasim, 1991). Racun ubur-ubur membentuk ikatan pada membran sel target diikuti adanya oligomerisasi membentuk pori-pori membran. Pembentukan pori-pori membran pada sel eritrosit inilah menyebabkan hemolisis. Komponen peptida litik menyebabkan peningkatan permeabilitas sel yang berpengaruh terhadap transpor ion, pembengkakan sel, dan terjadinya lisis akibat perbedaan tekanan osmotik (Mariottini, 2014 dan Edwards *et al.*, 2002).

Penelitian berbasis herbal kian dikembangkan, salah satunya ialah kakao. Kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan salah satu komoditas unggulan Kabupaten Jember. Biji kakao mengandung lemak, karbohidrat, protein, dan senyawa polifenol yang berguna sebagai antioksidan. Polifenol yang terkandung pada kakao berupa *epicatechin*, *catechins*, dan *procyanidins* berfungsi untuk menghambat hemolisis pada tikus percobaan, sehingga senyawa ini dapat memberikan perlindungan dan memperkuat resistensi terhadap hemolisis (Weishburger, 2001). Berdasarkan latar belakang tersebut, maka peneliti ingin melakukan penelitian untuk mengetahui potensi ekstrak kakao (*Theobroma cacao* L.) dalam menghambat kerusakan eritrosit yang diinduksi racun *Physalia utriculus* secara *in vitro*.

Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian *true experimental* secara *in vitro* dengan rancangan *post test only control group design*. Populasi yang digunakan ialah *whole blood* 3 ml yang diambil dari manusia sehat dengan golongan darah O, berusia 21 tahun, dan tidak memiliki riwayat penyakit koagulan. Pemilihan sampel dilakukan dengan *simple random sampling* berupa 28 sampel eritrosit yang telah dipilih dibagi menjadi tujuh kelompok, yaitu kelompok kontrol normal, kontrol positif, kontrol negatif, dan perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol kakao 0,2%, 0,1%, 0,04%, dan 0,02%. Masing-masing kelompok terdiri dari 4 sampel eritrosit. Seluruh data dianalisis dengan uji *Shapiro-Wilk* untuk uji normalitas dan dilakukan uji homogenitas. Jika hasil dari uji normalitas berupa data normal dan varian kelompok homogen maka dapat dilakukan analisis dengan uji *One Way Anova*. *One Way Anova*. Jika hasil analisis data signifikan ($p < 0,05$) dapat dilanjutkan dengan uji *post hoc* untuk mengetahui perbedaan secara signifikan antar kelompok perlakuan.

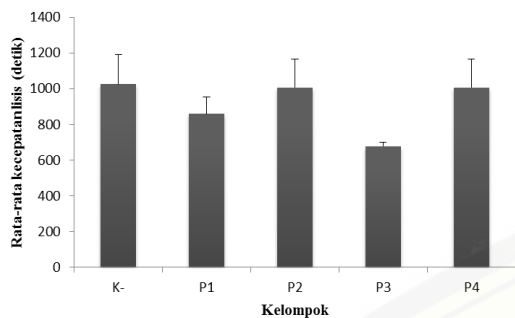
Hasil Penelitian

Hasil pengamatan kecepatan lisis dilakukan dalam satu waktu dan didapatkan data rerata kecepatan lisis (detik) \pm standar deviasi pada tiap kelompok, seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Rerata kecepatan lisis tiap kelompok (detik)

No	Kelompok	Rerata \pm Standar Deviasi
1.	Kontrol negatif	1.025 \pm 164,63
2.	Kelompok P1	858,25 \pm 94,44
3.	Kelompok P2	1000,5 \pm 159,93
4.	Kelompok P3	678,5 \pm 19,71
5.	Kelompok P4	1.006 \pm 159,50

Grafik penghitungan rerata kecepatan lisis eritrosit dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 4.1 Grafik rerata kecepatan lisis

Kelompok kontrol negatif dengan pemberian racun *Physalia utriculus* memiliki rerata kecepatan lisis paling lama, diikuti kelompok P4 dengan pemberian ekstrak etanol kakao 0,02%, kelompok P2 dengan pemberian ekstrak etanol kakao 0,1%, kelompok P1 dengan pemberian ekstrak etanol kakao 0,2%, dan kelompok P3 dengan pemberian ekstrak etanol kakao 0,04%.

Hasil uji normalitas *Saphiro-Wilk* didapatkan $p > 0,05$. Hasil uji homogenitas *Lavene's Test* didapatkan $p < 0,05$. Data kemudian ditransformasi dan diperoleh nilai akhir $p > 0,05$. Hasil kedua analisis tersebut menunjukkan bahwa data kelima kelompok terdistribusi normal dan memiliki varian yang sama atau homogen, kemudian dilanjutkan dengan uji *One Way Anova* untuk mengetahui apakah ada perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian. Hasil Uji *One Way Anova* didapatkan $p < 0,05$ menunjukkan bahwa terdapat perbedaan kecepatan lisis yang bermakna pada tiap kelompok, kemudian dilakukan uji analisis *post hoc* dengan metode Bonferoni. Hasil analisis *post hoc* Bonferoni menunjukkan perbedaan signifikan kecepatan lisis pada kelompok kontrol negatif (K-) terhadap kelompok P3, kelompok P3 terhadap kelompok P2 dan P4. Namun, tidak terdapat perbedaan kecepatan lisis antara kelompok kontrol negatif terhadap P1, P2, dan P4, kelompok P1 terhadap P2, P3, dan P4, serta kelompok P2 terhadap P4.

Pembahasan

Induksi racun *Physalia utriculus* dapat menyebabkan *blebbing membrane*, edema, dan lisis pada eritrosit. Racun *Physalia utriculus* mengganggu permeabilitas ion K^+ dan Na^+ pada membran plasma menyebabkan keluarnya ion K^+ yang berlebih dari membran dan

masuknya ion Na^+ yang berlebih. Peningkatan tekanan osmotik pada eritrosit tersebut mengakibatkan penurunan elastisitas eritrosit sehingga eritrosit mudah lisis. Komponen lain yang dapat menyebabkan lisis adalah hemolisin (Larasati, *et al.*, 2015).

Kelompok kontrol negatif dengan pemberian PBS yang diinduksi racun *Physalia utriculus* tanpa ekstrak etanol kakao menunjukkan kecepatan lisis paling lama sebesar $1.025 \pm 164,63$ dibandingkan dengan kelompok perlakuan. Hasil tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol kakao tidak berpotensi dalam menghambat kecepatan lisis eritrosit secara *in vitro*. Hal ini diduga dapat disebabkan oleh kandungan kafein dalam jumlah berlebih yang dapat mengakibatkan instabilitas membran eritrosit dan hemolisis (Lecomte dan Boivin 1981).

Bubuk kakao terdiri dari dua macam senyawa bioaktif, yaitu polifenol dan *methylxanthines* (teobromin dan kafein). Ekstraksi kakao menggunakan senyawa etanol menghasilkan senyawa antioksidan berupa flavonoid, katekin, epikatekin, antosianidin, dan proantosianidin (Hussain, 2015; Atikah *et al.*, 2016). Dalam hal ini senyawa polifenol berfungsi sebagai antioksidan yang dapat menghambat hemolisis, sedangkan kafein berperan sebagai pro-oksidan. Kafein merupakan salah satu bagian dari *methylxanthines* yang bersifat prooksidan dan mampu mengurangi kadar antioksidan di dalam bubuk kakao (Jalil dan Ismail, 2008). Sifat pro-oksidan dapat menyebabkan stres oksidatif pada membran sel. Stres oksidatif akan mengganggu integritas sel khususnya komponen fosfolipid penyusun membran sel, DNA, dan protein sel (Dalle-Donne *et al.*, 2006).

Faktor-faktor lain yang dapat mempengaruhi hasil penelitian ini terdiri dari beberapa hal, yaitu belum dilakukannya uji untuk analisis komponen fitokimia dari bubuk kakao sebelum dilakukannya penelitian, metode yang dilakukan merupakan metode baru yang belum pernah dilakukan pada penelitian-penelitian sebelumnya untuk menguji hemolisis melalui kecepatan lisis dari individu eritrosit, dan kualitas eritrosit yang berbeda dalam satu lapang pandang menyebabkan perbedaan dari kecepatan lisisnya eritrosit. Eritrosit yang berumur lebih tua memiliki potensi stres oksidatif lebih besar dibandingkan eritrosit yang lebih muda. Hal ini disebabkan karena eritrosit sebagai pembawa substansi oksigen yang akan terus menerus terpapar dengan oksigen menyebabkan stres oksidatif. Stres

oksidatif menyebabkan kerusakan pada membran sel dan terjadilah hemolisis (Maurya *et al.*, 2015).

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol kakao tidak berpotensi dalam menghambat kerusakan eritrosit yang diinduksi racun *Physalia utriculus* secara *in vitro*.

Daftar Pustaka

- Alam, J. M. dan Qasim, R. 1991. *Toxicology of Physalia's (Portuguese Man-O'-War) Venom*. Pakistan Journal of Pharmaceutical. 4: 159-168.
- Atikah, A. R., Hendrik S. B., dan Tuti K. 2016. *Antibacterial Effect of 70% Ethanol and Water Extract of Cacao Beans (Theobroma cacao L.) on Aggrebacter actinomycetemcomitans*. Dental Journal. 49 (2): 104-109.
- Dalle-Donne, *et al.* 2006. *Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease*. Clinical Chemistry. 52: 601-623.
- Edward, L. dan Heissinger, D. A. 2000. *Portuguese Man-of-War (Physalia physalis) Venom Induces Calcium Influx into Cells by Permeabilizing Plasma Membranes*. Toxicon. 38(8): 1015-1028.
- Hussain, N. 2015. *Effect of Different Solvents on Phytosterols and Antioxidant Activity of Cocoa Beans*, International Journal of Food Engineering. 1 (1): 15-20.
- Jalil, A. M. M. dan Ismail, A. 2008. *Polyphenol in Cocoa and Cocoa Products: Is There A Link between Antioxidant Properties and Health?*. Molecules. 13: 2190-2219.
- Larasati, D. M., Al M., dan Roni, P. 2015. *Pengaruh Induksi Racun Ubur-Ubur (Physalia utriculus) terhadap Perubahan Gambaran Morfologi Eritrosit Tikus Wistar (In Vivo) dan Eritrosit Manusia (In Vitro)*. Jurnal Pustaka Kesehatan.
- Lecomte, M. C. dan Boivin, P. 1981. *Filterability and Pharmacology. Effects of Methylxanthine Derivatives on Red Cell Phosphorylation*. Scand J Clin Lab Invest Suppl. 156:291-295.
- Mariottini, G. L. 2014. *Hemolytic Venoms from Marine Cnidarian Jellyfish - An Overview*. Jurnal of Venom Research. 5: 22-32.
- Maurya, P. K., Prabhanshu K., Pranjal C. 2015. *Biomarkers of Oxidative Stress in Erythrocytes as A Function of Human Age*. World Journal of Methodology. 5 (4): 216-222.
- Mujiono, N. 2010. *Jellyfish Sting: An Indonesian Case Report*. Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan. 2: 1.
- Tibbals, J. 2006. *Australian Venomous Jellyfish, Envenomation Syndromes, Toxins and Therapy*. Toxicon. 48: 830-859.
- Weisburger, J. H. 2001. *Chemo preventive Effects of Cocoa Polyphenols on Chronic Diseases*. Exploraton Biology and Medicine. 10(226): 891-897.