



**UJI EFEKTIVITAS ANTIINFLAMASI EKSTRAK KULIT
KAKAO (*Theobroma cacao L.*) TERHADAP VOLUME EDEMA
TELAPAK KAKI MENCIT YANG DIINDUKSI KARAGENIN**

SKRIPSI

Oleh

Faradila Praginta Syaputri

NIM 142010101089

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS JEMBER

2017



**UJI EFEKTIVITAS ANTIINFLAMASI EKSTRAK KULIT
KAKAO (*Theobroma cacao L.*) TERHADAP VOLUME EDEMA
TELAPAK KAKI MENCIT YANG DIINDUKSI KARAGENIN**

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

Faradila Praginta Syaputri

NIM 142010101089

FAKULTAS KEDOKTERAN

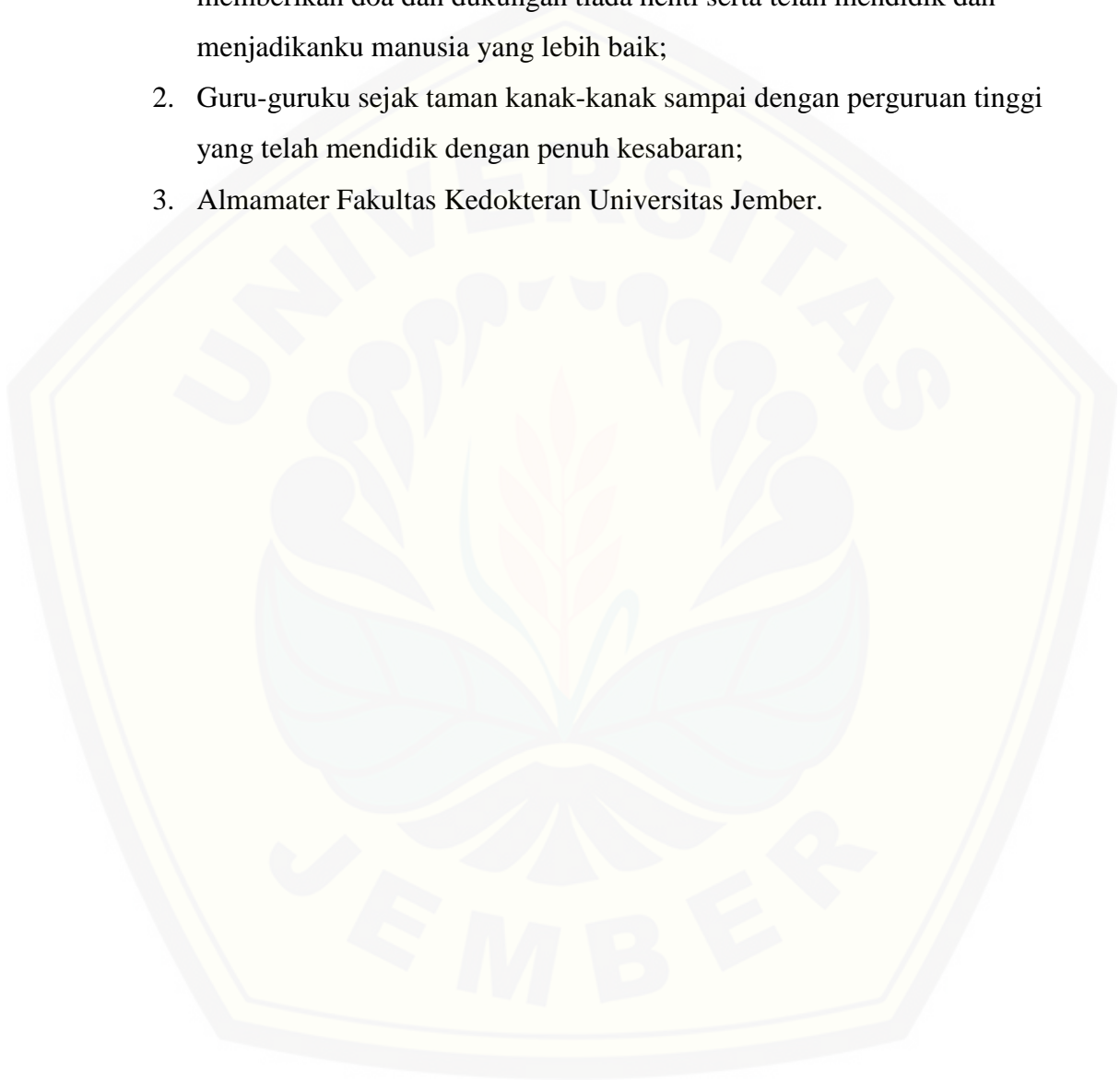
UNIVERSITAS JEMBER

2017

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Kedua orang tuaku, Bapak Sugiono dan Ibu Pramugawati yang senantiasa memberikan doa dan dukungan tiada henti serta telah mendidik dan menjadikanku manusia yang lebih baik;
2. Guru-guruku sejak taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi yang telah mendidik dengan penuh kesabaran;
3. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.



MOTO

Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman diantara kamu dan orang-orang yang berilmu pengetahuan beberapa derajat. Dan Allah Maha mengetahui apa yang kamu kerjakan (terjemahan Surat *Al-Mujadillah* ayat 11)^{*)}



*) Departemen Agama Republik Indonesia. 2007. *Al-Qur'an Al-Mujadillah dan Terjemahan Makna ke Dalam Bahasa Indonesia*. Bogor: Sygma.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Faradila Praginta Syaputri

NIM : 142010101089

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

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

Jember, 12 Desember 2017

Yang menyatakan,

Faradila Praginta Syaputri
NIM 142010101089

SKRIPSI

**UJI EFEKTIVITAS ANTIINFLAMASI EKSTRAK KULIT KAKAO
(*Theobroma cacao L.*) TERHADAP VOLUME EDEMA TELAPAK KAKI
MENCIT YANG DIINDUKSI KARAGENIN**

Oleh
Faradila Praginta Syaputri
NIM 142010101089

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama
Dosen Pembimbing Anggota

: dr. Desie Dwi Wisudanti, M. Biomed
: dr. M. Ali Shodikin, M.kes, Sp. A.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Uji Efektivitas Antiinflamasi Ekstrak Kulit Kakao (*Theobroma cacao L.*) terhadap Volume Edema Telapak Kaki Mencit yang Diinduksi Karagenin” karya Faradila Praginta Syaputri telah diuji dan disahkan pada:

hari, Tanggal : Selasa, 12 Desember 2017

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Tim Penguji :

Penguji I,

Penguji II,

dr. Cicih Komariah, Sp. M
NIP 19740928200502001

dr. Adelia Handoko, M.Si
NIP 198901072014042001

Penguji III,

Penguji IV,

dr. Desie Dwi Wisudanti, M. Biomed
NIP 198212112008122002

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

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember

dr. Enny Suswati, M.Kes
NIP 197002141999032001

RINGKASAN

Uji Efektivitas Antiinflamasi Ekstrak Kulit Kakao (*Theobroma cacao L.*) terhadap Volume Edema Telapak Kaki Mencit yang Diinduksi Karagenin; Faradila Praginta Syaputri, 142010101089; 2017: 71 halaman; Jurusan Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Indonesia merupakan salah satu negara penghasil kakao (*Theobroma cacao L.*) terbesar di dunia. Selama ini bagian kakao yang sering dimanfaatkan dalam bidang industri adalah bijinya, sedangkan kulit kakao biasanya hanya menjadi limbah perkebunan. Padahal kulit kakao masih mengandung senyawa-senyawa fungsional seperti katekin, epikatekin, antosianidin, prosianidin dan proantosianidin. Senyawa-senyawa tersebut dapat menghambat COX-2, prostaglandin, dan mediator-mediator proinflamasi lainnya (TNF- α , NO, IL-1 dan IL-6), sehingga dapat dimanfaatkan sebagai antiinflamasi. Selama ini obat antiinflamasi yang sering digunakan adalah obat golongan NSAID.

Antiinflamasi digunakan untuk mengurangi rasa tidak nyaman yang disebabkan oleh respons inflamasi seperti kemerahan (*dolor*), rasa panas (*kalor*), nyeri (*rubor*), edema (*tumor*), dan gangguan fungsi (*functio laesa*). Respons inflamasi merupakan respons imun alami yang ditimbulkan oleh cedera atau kerusakan jaringan, yang berfungsi menetralisasi dan mengeliminasi agen yang menimbulkan cedera, tetapi jika proses ini berlangsung secara terus menerus (kronis) justru akan merusak jaringan.

Jenis penelitian ini adalah *quasi experimental post test only control group design*, bertujuan untuk mengetahui efektivitas antiinflamasi ekstrak kulit kakao yang dilihat dari pengurangan volume edema telapak kaki mencit yang diinduksi karagenin. Penelitian ini dilaksanakan di dua tempat, yaitu di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember untuk pemeliharaan dan perlakuan terhadap hewan coba dan Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Jember untuk pembuatan ekstrak kulit kakao. Jumlah sampel yang digunakan adalah 28 ekor mencit jantan (*Mus musculus*) yang terbagi menjadi 7

kelompok, yaitu kelompok kontrol positif ($K_{(+)}$), kelompok kontrol negatif ($K_{(-)}$), kelompok perlakuan 1 ($K_{(1)}$), kelompok perlakuan 2 ($K_{(2)}$), kelompok perlakuan 3 ($K_{(3)}$), kelompok perlakuan 4 ($K_{(4)}$) dan kelompok perlakuan 5 ($K_{(5)}$). Kelompok $K_{(+)}$ diberikan Natrium diklofenak dengan dosis 0,0048 mg/gBB, kelompok $K_{(-)}$ diberikan NaCMC 1%, dan kelompok perlakuan $K_{(1)}$, $K_{(2)}$, $K_{(3)}$, $K_{(4)}$, dan $K_{(5)}$ diberikan ekstrak kulit kakao dengan dosis 0,25 mg/gBB, 0,5 mg/gBB, 1 mg/gBB, 2 mg/gBB, dan 4 mg/gBB yang diberikan secara per oral 30 menit sebelum injeksi 0,05 mL karagenin 1% pada telapak kaki mencit. Pengukuran volume edema dilakukan 3 jam pasca injeksi menggunakan alat pletismometer digital.

Data yang didapat berupa persentase daya antiinflamasi dan volume edema dengan satuan mL. Nilai persentase daya antiinflamasi tiap kelompok adalah $K_{(+)}$ 51,52%; $K_{(1)}$ 19,69%; $K_{(2)}$ 27,27%; $K_{(3)}$ 31,82%; $K_{(4)}$ 36,36%; dan $K_{(5)}$ 36,36%. Hasil pengukuran rata-rata volume edema dan standar deviasi tiap kelompok adalah $K_{(-)}$ $0,165 \pm 0,01291$; $K_{(+)}$ $0,080 \pm 0,00957$; $K_{(1)}$ $0,133 \pm 0,01258$; $K_{(2)}$ $0,120 \pm 0,00816$; $K_{(3)}$ $0,113 \pm 0,00957$; $K_{(4)}$ $0,105 \pm 0,01291$; dan $K_{(5)}$ $0,105 \pm 0,01291$. Hasil pengukuran volume edema dianalisis dengan menggunakan *One Way ANOVA* dan dilanjutkan uji *Post Hoc multiple comparisons LSD (Least Significant Difference)*. Hasil penelitian ini adalah terdapat perbedaan yang bermakna antara rata-rata volume edema kelompok $K_{(-)}$ dengan kelompok perlakuan ekstrak kulit kakao ($p < 0,05$). Berdasarkan hasil penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa ekstrak kulit kakao memiliki efektivitas antiinflamasi yang dilihat dari adanya pengurangan volume edema telapak kaki mencit yang diinduksi karagenin dan memiliki persentase daya antiinflamasi yang lebih rendah daripada natrium diklofenak.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Uji Efektivitas Antiinflamasi Ekstrak Kulit Kakao (*Theobroma cacao L.*) terhadap Volume Edema Telapak Kaki Mencit yang Diinduksi Karagenin”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

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

1. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
2. dr. Enny Suswati, M.Kes selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember atas segala fasilitas dan kesempatan yang diberikan selama menempuh pendidikan kedokteran di Universitas Jember;
3. dr. Desie Dwi Wisudanti, M.Biomed selaku Dosen Pembimbing Utama dan dr. M. Ali Shodikin, M.Kes, Sp. A selaku Dosen Pembimbing Anggota yang selalu membimbing dan memberi saran yang membangun terhadap penulisan skripsi ini;
4. dr. Cicih Komariah, Sp. M dan dr. Adelia Handoko, M.Si. sebagai dosen penguji yang banyak memberikan kritik, saran dan masukan yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
5. Bapak Sugiono dan Ibu Pramugawati, orang tuaku yang tercinta dan aku banggakan terimakasih atas semua bantuan moril dan materil yang telah diberikan serta doa dan kasih sayang yang tak terbatas kepada penulis.
6. M. Fadzika Ardan, saudaraku yang selalu memberikan semangat kepada penulis.
7. Mbak Nurul Istinaroh, Amd selaku Analis Laboratorium Biokimia, Mbak Lilik Maslian, A.Md selaku analis Laboratorium Farmakologi dan Mas Agus yang telah memberikan bantuan dalam penelitian ini;
8. Rekan kerjaku, Yuli Lusiana Sari yang telah membantu dan selalu memberikan dorongan serta semangat selama penelitian;

9. Sahabat-sahabatku, Nastiti Bekti U., Fa'izah Ramadhani S., Ainindya Pasca R., T. Ariani W. dan Prayoga Triyadi K. P. yang telah memberikan semangat untuk cepat menyelesaikan penelitian ini;
10. Kakak tingkatku, Emma Enggar S. dan Faizah Giftari yang selalu membimbing dan membantu saya dalam menyusun skripsi ini;
11. Teman-teman angkatan 2014 tercinta yang telah berjuang bersama-sama selama 3,5 tahun di Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
12. Semua pihak yang telah memberikan bantuan dan dukungan dalam penyusunan skripsi ini yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis mengaharap kritik dan saran yang membangun dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 12 Desember 2017

Penulis

DAFTAR ISI

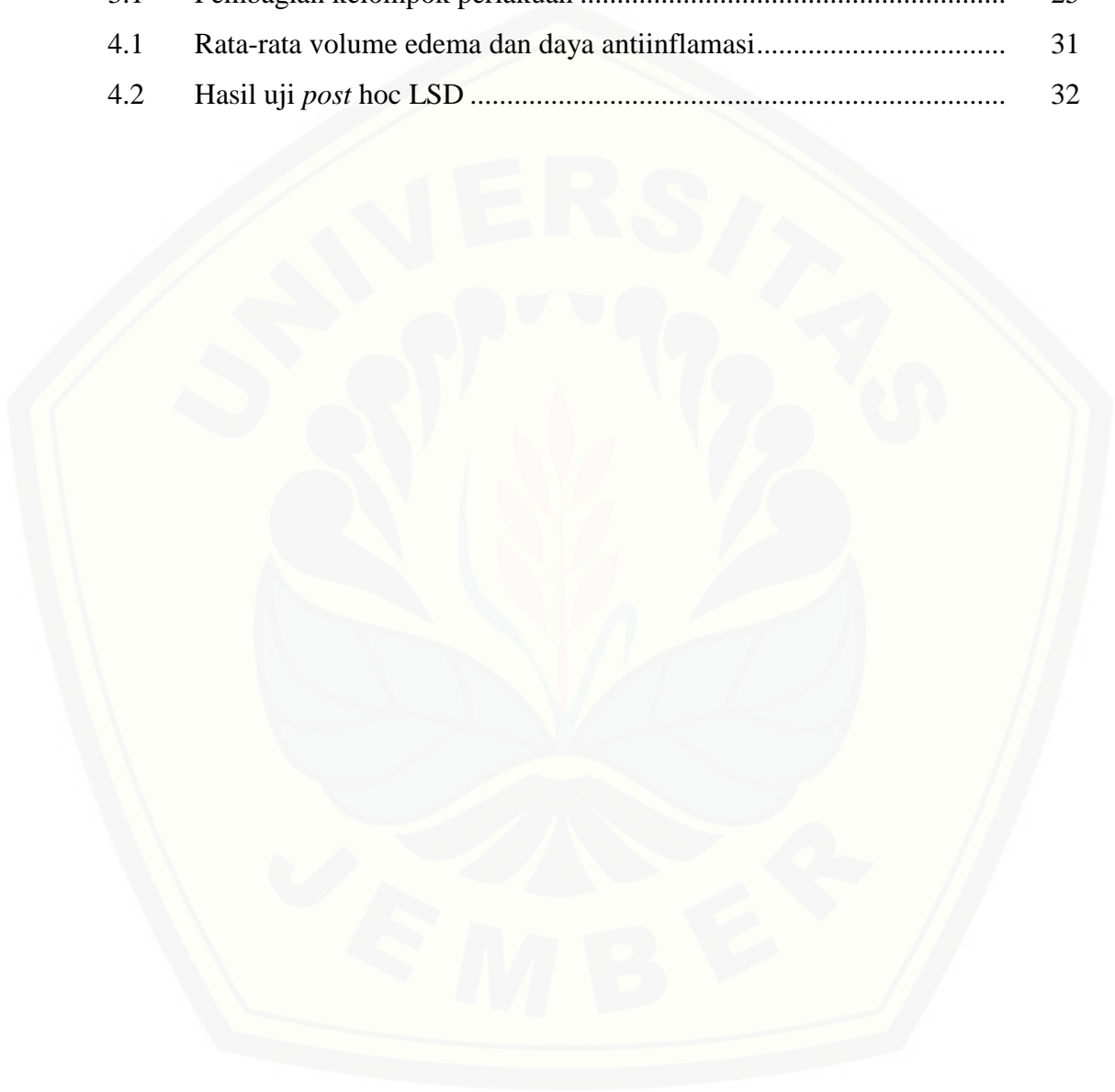
	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
DAFTAR SINGKATAN	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
1.4.1 Manfaat bagi Peneliti.....	3
1.4.2 Manfaat bagi Institusi	4
BAB 2. TINAJUAN PUSTAKA	5
2.1 Kakao	5
2.1.1 Klasifikasi Umum.....	5
2.1.2 Morfologi Umum.....	5
2.1.3 Manfaat	6
2.1.4 Kandungan Kimia Kakao	7

2.1.5	Efek Kakao terhadap Inflamasi	8
2.2	Inflamasi	8
2.3	Natrium Diklofenak	11
2.3.1	Farmakodinamik.....	11
2.3.2	Farmakokinetik.....	11
2.3.3	Indikasi	12
2.3.4	Efek Samping	13
2.4	Metode Uji Efektivitas Antiinflamasi	13
2.5	Karagenin	15
2.5	Kerangka Teori	17
2.6	Kerangka Konsep	18
2.7	Hipotesis	18
BAB 3.	METODE PENELITIAN	19
3.1	Jenis Penelitian	19
3.2	Rancangan Penelitian	19
3.3	Populasi dan Sampel Penelitian	20
3.4	Tempat dan Waktu Penelitian	21
3.5	Variabel Penelitian	21
3.5.1	Variabel Bebas.....	21
3.5.2	Variabel Terikat.....	21
3.5.3	Variabel Terkendali	21
3.6	Definisi Operasional	22
3.6.1	Ekstrak Kulit Kakao	22
3.6.2	Natrium Diklofenak.....	22
3.6.3	<i>Sodium Carboxymethyl Cellulose</i> (NaCMC)	23
3.6.4	Karagenin.....	23
3.6.5	Efektivitas Antiinflamasi.....	23
3.7	Alat dan Bahan Penelitian	23
3.7.1	Alat Penelitian	23
3.7.2	Bahan Penelitian	24
3.8	Prosedur Penelitian	24

3.8.1 Uji Kelayakan Etik	24
3.8.2 Adaptasi Hewan Coba	24
3.8.3 Pemilihan Hewan Coba	24
3.8.4 Pembagian Kelompok Perlakuan.....	25
3.8.5 Pembuatan Ekstrak Kulit Kakao.....	25
3.8.6 Perlakuan pada Kelompok Sampel.....	26
3.8.7 Perhitungan % Daya Antiinflamasi	27
3.9 Analisis Data	28
3.10 Alur Penelitian	29
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	30
4.1 Hasil Penelitian	30
4.1.1 Pembuatan Ekstrak Kakao.....	30
4.1.2 Uji Daya Antiinflamasi	30
4.1.3 Analisis Data	31
4.2 Pembahasan.....	33
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	36
DAFTAR PUSTAKA	37
LAMPIRAN.....	42

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Pengaruh ekstrak fenol dan flavonol kakao	7
3.1 Pembagian kelompok perlakuan	25
4.1 Rata-rata volume edema dan daya antiinflamasi.....	31
4.2 Hasil uji <i>post hoc</i> LSD	32

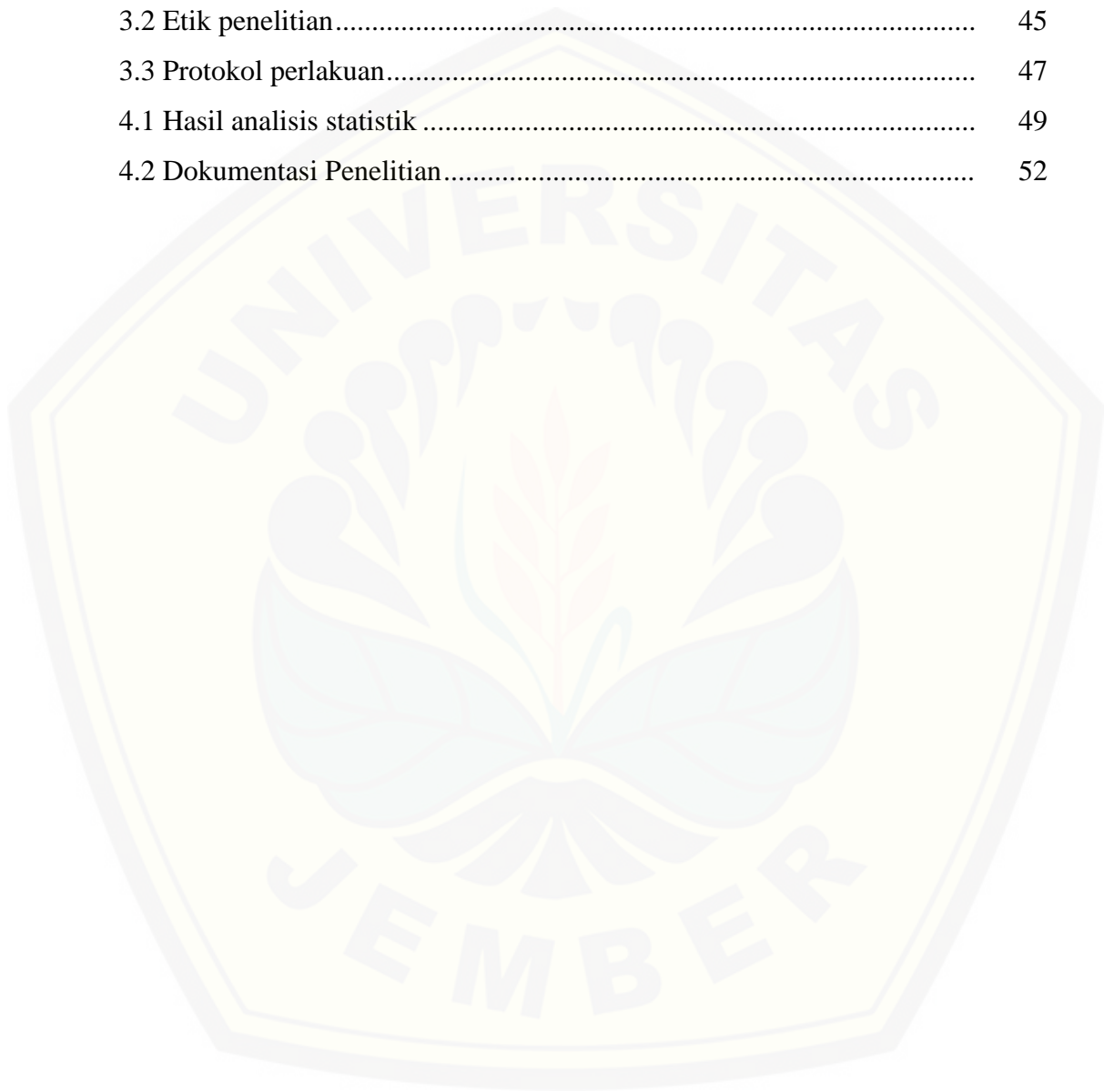


DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Buah kakao (<i>Theobroma cacao L.</i>)	6
2.2 Manifestasi lokal pada peradangan akut	10
2.3 Struktur kimia natrium diklofenak	11
2.4 Produksi metabolis asam arakidonat	12
2.5 Kerangka teori	17
2.6 Kerangka konsep	18
3.1 Skema rancangan penelitian	19
3.2 Pletismometer digital	27
3.3 Skema dan Alur Penelitian	29
4.1 Grafik perbandingan rata-rata volume edema	32

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
3.1 Determinasi tanaman kakao (<i>Theobroma cacao L.</i>).....	42
3.2 Etik penelitian.....	45
3.3 Protokol perlakuan.....	47
4.1 Hasil analisis statistik	49
4.2 Dokumentasi Penelitian.....	52



DAFTAR SINGKATAN

COX	= siklooksigenase
TNF- α	= tumor necrosis factor - α
NO	= nitrit oksida
IL-1	= interleukin-1
IL-6	= interleukin-6
NF- κ B	= nuclear factor-kappaB
iNOS	= inducible nitric oxide synthase
NSAID	= non steroid anti inflammatory drug
LPS	= lipopolisakarida
PGE	= prostaglandin
NaCMC	= natrium karboksimetil selulosa

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kakao (*Theobroma cacao L.*) merupakan salah satu komoditi ekspor perkebunan di Indonesia yang memiliki nilai jual yang tinggi. Pada tahun 2011 produksi biji kakao di Indonesia mencapai 600.000 ton. Jumlah tersebut menempatkan Indonesia sebagai urutan ketiga negara penghasil kakao terbesar setelah Pantai Gading dan Ghana (*International Trade Statistic*, 2012). Kakao merupakan produk perkebunan unggulan Kabupaten Jember, jumlah produksi kakao dari PTPN XII yang ada di Jember sebesar 2.989 ton (Nurbahar, 2014). Semakin besar produksi kakao, maka semakin besar juga jumlah limbah kakao yang berupa kulit kakao. Limbah yang dihasilkan dari produksi kakao mencapai 75% dari total produksi (Wahyudi *et al.*, 2008). Sampai sekarang limbah kulit kakao belum dimanfaatkan secara optimal dan nilai ekonomisnya masih rendah. Limbah merupakan bagian dari produk hasil pertanian yang pengelolaannya perlu mendapat perhatian. Umumnya limbah kulit kakao hanya ditimbun di sekitar perkebunan saja, sehingga dapat menimbulkan pencemaran lingkungan dan menjadi salah satu penyebab penyakit busuk pada tanaman kakao (Sartini *et al.*, 2012). Limbah pertanian jika tidak dikelola dengan baik sering menjadi tempat berkembang biak hama dan penyakit, terjadinya pencemaran (polusi) udara berupa gas metana (CH₄), CO₂ dan N₂O (Panjaitan *et al.*, 2015).

Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa kulit kakao mengandung senyawa fenolik seperti katekin, epikatekin, antosianidin dan proantosianidin (Arlorio *et al.*, 2005), bahkan kandungan senyawa fenolik tersebut dapat ditemukan lebih banyak pada kulit kakao dibandingkan pada bijinya (Kumari *et al.*, 2011). Senyawa fenolik tersebut merupakan hasil dari metabolit sekunder yang mempunyai efek antiinflamasi karena dapat menghambat perubahan asam arakidonat menjadi prostaglandin melalui jalur siklooksigenase dan menghambat mediator-mediator proinflamasi seperti TNF- α , NO, IL-1, dan IL-6 (Ramiro *et al.*, 2013).

Inflamasi merupakan respons imun alami yang ditimbulkan oleh cedera atau kerusakan jaringan, yang berfungsi menetralisasi dan mengeliminasi agen yang menimbulkan cedera (Kumar *et al.*, 2013). Adanya rangsangan iritan atau cedera jaringan akan memicu pelepasan mediator-mediator proinflamasi dari jaringan yang rusak, sel mast, leukosit dan komplemen. Mediator-mediator tersebut dapat menyebabkan perubahan vaskuler seperti vasodilatasi dan peningkatan permeabilitas vaskuler yang dapat menimbulkan respons inflamasi (Guyton, 2006).

Respons inflamasi ditandai dengan timbulnya tanda klasik inflamasi, yaitu *rubor, calor, dolor, tumor* dan *functio laesa* (Dorland, 2010). Respons inflamasi terjadi karena adanya benda asing atau kerusakan jaringan sehingga menyebabkan terlepasnya mediator-mediator proinflamasi seperti prostaglandin, leukotrien, histamin, bradikinin, sitokin, dan kemokin. Respons inflamasi sebenarnya merupakan salah satu mekanisme pertahanan tubuh sebagai perlindungan dari adanya benda asing atau kerusakan jaringan, tetapi jika proses ini berlangsung secara terus menerus (kronis) justru akan merusak jaringan (Kumar *et al.*, 2013). Biasanya inflamasi kronis terjadi pada penderita *arthritis*, diabetes, lupus eritematosus sistemik, dan penyakit autoimun (Dinarello, 2010). Respons inflamasi dapat membuat penderita menjadi tidak nyaman karena rasa nyeri atau edema yang ditimbulkan, sehingga untuk mengurangi rasa tidak nyaman tersebut diperlukan obat antiinflamasi (Marlicz *et al.*, 2014).

Non Steroidal Anti Inflammatory Drugs (NSAID) adalah obat antiinflamasi yang sering digunakan di seluruh dunia dengan jumlah pengguna lebih dari 30 juta setiap harinya (AGA, 2014). *Non Steroidal Anti Inflammatory Drugs* yang sering digunakan adalah diklofenak dan ibuprofen. Salah satu efek samping penggunaan NSAID pada sistem pencernaan adalah kerusakan mukosa lambung. Hal itu terjadi karena selain menghambat COX-2, NSAID juga menghambat COX-1 yang merupakan enzim katalisator dalam produksi prostasiklin yang berfungsi untuk melindungi mukosa lambung (Syarif *et al.*, 2012).

Kabupaten Jember memiliki perkebunan kopi dan kakao yang cukup luas, yaitu 7.011 Ha (Nurbahar, 2014), selain itu Jember juga merupakan salah satu tempat pusat penelitian kopi dan kakao di Indonesia, sehingga kondisi tersebut sangat mendukung adanya kegiatan penelitian tentang pemanfaatan kakao (*Theobroma cacao L.*). Berdasarkan latar belakang tersebut peneliti bermaksud ingin mengetahui efektivitas antiinflamasi ekstrak kulit kakao (*Theobroma cacao L.*) yang dilihat dari pengurangan volume edema telapak kaki mencit yang diinduksi karagenin.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka rumusan masalah dari penelitian ini, yaitu bagaimana efektivitas antiinflamasi ekstrak kulit kakao terhadap pengurangan volume edema telapak kaki mencit yang diinduksi karagenin?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan uraian di atas, tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui efektivitas antiinflamasi ekstrak kulit kakao terhadap pengurangan volume edema telapak kaki mencit yang diinduksi karagenin.
2. Mengetahui daya antiinflamasi ekstrak kulit kakao dibandingkan dengan natrium diklofenak.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat bagi Peneliti

Menambah informasi ilmiah dalam bidang farmakologi mengenai efektivitas antiinflamasi ekstrak kulit kakao terhadap pengurangan volume edema telapak kaki mencit yang diinduksi karagenin.

1.4.2 Manfaat bagi Institusi

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



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kakao

2.1.1 Klasifikasi Umum

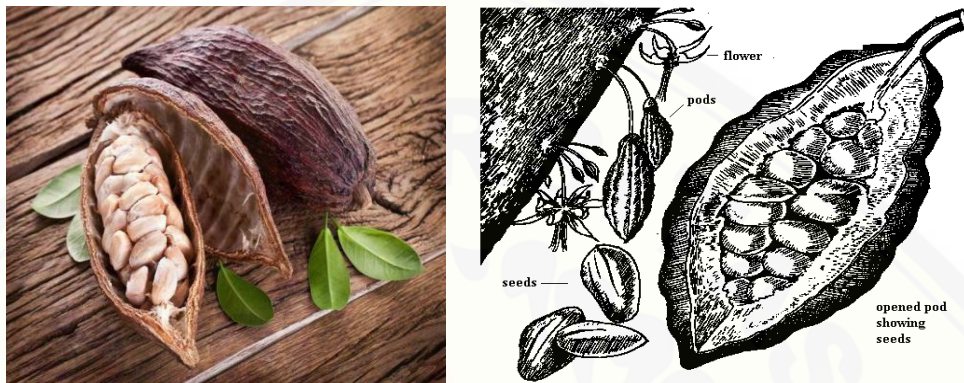
Klasifikasi tanaman kakao (*Theobroma cacao L.*) menurut *United States Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Services* adalah :

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

2.1.2 Morfologi Umum

Kakao (*Theobroma cacao L.*) merupakan tanaman perkebunan dengan tinggi sekitar 5-7 meter. Batang dan daun kakao mempunyai sifat *dimorfisme*, yaitu mempunyai dua bentuk tunas vegetatif. Tunas yang pertumbuhannya ke atas disebut *orthotrop* dan yang ke samping disebut *plagiotrop*. Daun kakao merupakan daun tunggal, susunan tulang daun menyirip, berbentuk bulat-oval serta runcing dikedua ujungnya. Tanaman kakao bersifat kauliflori, yakni bunga tumbuh dan berkembang dari bekas ketiak daun. Tempat tumbuh bunga perlahan-lahan akan membesar dan menebal membentuk suatu bantalan bunga yang berpotensi berkembang menjadi kakao. Bunga kakao merupakan bunga sempurna yang terdiri dari 5 kelopak bunga, dan 10 tangkai benang sari. Warna bunga kakao memiliki banyak variasi yaitu putih, ungu atau kemerahan. Warna bunga ini khas pada setiap kultivar. Tangkai bunga kecil dengan panjang 2-4 cm. Buah kakao memiliki bentuk dan warna yang bervariasi, tergantung dengan kultivarnya.

Tetapi secara umum ada dua macam warna, yaitu buah yang ketika muda berwarna hijau bila sudah masak berwarna kuning dan buah yang ketika muda berwarna merah bila sudah masak berwarna oranye (Gambar 2.1). Buah kakao akan masak setelah berumur 5-6 bulan dan memiliki panjang sekitar 10-30 cm (Wahyudi *et al.*, 2008).



Gambar 2.1 Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) (Sumber: Dodge, 2016)

Dalam buah kakao terdapat biji yang tersusun 5 baris mengelilingi poros buah, jumlahnya antara 20-50 biji per buah. Biji kakao diselimuti oleh lapisan lunak putih (pulpa) yang memiliki rasa asam-manis. Disebelah dalam pulpa terdapat kulit biji (testa) yang membungkus kotiledon. Umumnya buah kakao terdiri dari 75% bagian kulit (pod kakao), 22% biji (umumnya satu buah kakao terdiri dari 30-40 biji yang diselimuti oleh pulp) dan 3% plasenta (kulit ari pembungkus biji kakao) (Wahyudi *et al.*, 2008).

2.1.3 Manfaat

a. Daun

Daun kakao bermanfaat sebagai antioksidan, antiseptik, antidiuretik, dan *emmenagogue* (meningkatkan aliran darah saat *menarche*) (Panganiban *et al.*, 2012).

b. Biji

Selain sebagai bahan baku pembuatan coklat, biji kakao juga bermanfaat sebagai antioksidan (Othman *et al.*, 2007).

c. Kulit

Dibidang pertanian dan peternakan, kulit kakao dapat dijadikan pakan ternak dan pupuk kompos. Dibidang kesehatan, kulit kakao bermanfaat sebagai antioksidan dan antimikroba karena kaya akan kandungan senyawa fenolik seperti katekin, epikatekin, dan prosianidin (Sartini *et al.*, 2011).

2.1.4 Kandungan Kimia Kakao

Selain mengandung selulosa (24,51%), hemiselulosa (23,36%) dan lignin (30,46%) (Rambat *et al.*, 2015), kulit kakao juga mengandung senyawa fenolik (12,6%) seperti katekin, epikatekin, prosianidin, tanin, dan flavonoid lainnya (Tabel 2.1) (Fapohunda *et al.*, 2012), bahkan kandungan senyawa fenolik tersebut ditemukan lebih banyak pada kulit kakao dibandingkan dengan bijinya (Kumari *et al.*, 2011). Ada perbedaan yang signifikan antara jumlah kandungan senyawa fenolik pada kulit kakao (74,12 mg GAE/gDW) dibandingkan biji kakao (71,20 mg GAE/gDW) (Kumari *et al.*, 2011). Analisis fitokimia menggunakan Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) menunjukkan ekstrak kulit biji kakao mengandung 2,3-butanediol (6,45%), *benzeneacetic acid* (2,33%), kafein (23,51%), dan *theobromine* (65,99%). Pengujian toksisitas berdasarkan metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) menunjukkan nilai LC₅₀ ekstrak kulit biji kakao adalah 39.595,27 ppm, artinya ekstrak tersebut tidak bersifat toksik terhadap larva *Artemia salina* (Kayaputri *et al.*, 2014).

Tabel 2.1 Pengaruh ekstrak fenol dan flavonol kakao

Polifenol	Konsentrasi	Efek
Ekstrak polifenol kakao	50 µM	↓ PGE
	5–80 µg/mL	↓ TNF-α, ↓ IL-1α, ↓ IL-6, ↓NO
	0,1-10 µg/mL	↓ IL-1α, ↓ IL-6
	10 µg/mL	↓ TNF-α, ↓COX-2, ↓ iNOS dan ↓NF-κB
Prosianidin	2.5–60 µM	↓ TNF-α, ↓ NF-κB, ↓iNOS
	10–25 µg/mL	↓ TNF-α
Prosianidin B2	1.7–50 µM	↓ NF-κB, ↓ TNF-α
Epikatekin	5–25 µg/mL	↓ LPS yang diinduksi nitrite dan ↓TNF-α

Sumber: Goya L. *et al.*, 2016

2.1.5 Efek Kakao terhadap Inflamasi

Proxianidin yang terdapat pada kakao dapat menghambat TNF- α yang diinduksi oleh ikatan NF- κ B dan iNOS sehingga dapat berpotensi sebagai antiinflamasi karena dapat menghambat adhesi dan migrasi leukosit (Erlejman *et al.*, 2008). Katekin yang terdapat pada kakao juga dapat dijadikan antiinflamasi karena dapat menghambat faktor-faktor inflamasi seperti NF- κ B, iNOS, dan molekul-molekul adhesi (Tarek *et al.*, 2011). Katekin dan epikatekin dapat menghambat enzim siklooksigenase, sehingga dapat menghambat konversi asam arakidonat menjadi prostaglandin (Parsaeyan *et al.*, 2014). Ketika prostaglandin dihambat, maka efek vasodilatasi dan peningkatan permeabilitas pada pembuluh darah akan berkurang, sehingga semakin sedikit cairan kaya protein yang keluar dari pembuluh darah. Hal tersebut membuat akumulasi cairan kaya protein di ekstrasvaskuler yang menyebabkan edema pada jaringan lokal berkurang (Lazzarini *et al.*, 2006). Berdasarkan penelitian pada kultur makrofag peritoneal secara *ex vivo* menunjukkan bahwa ekstrak kakao menurunkan aktivitas mediator-mediator yang berperan penting dalam proses inflamasi yaitu IL-1, IL-6, NO dan TNF- α (Andújar *et al.*, 2011).

2.2 Inflamasi

Inflamasi adalah suatu respons pertahanan alami tubuh terhadap cedera sel atau jaringan yang disebabkan oleh mikroorganisme, trauma fisik, zat toksik, respons imun, alergi serta suhu yang ekstrim (Kumar *et al.*, 2013). Inflamasi dapat menyebabkan pengiriman cairan dan mediator-mediator proinflamasi dari sirkulasi darah ke jaringan interstisial yang cedera (Price *et al.*, 2012). Mediator proinflamasi yang dikeluarkan saat inflamasi menyebabkan timbulnya respons inflamasi yang ditandai dengan timbulnya tanda klasik inflamasi, yaitu kemerahan (*rubor*), rasa panas (*kalor*), nyeri (*dolor*), pembengkakan (*tumor*) dan perubahan fungsi (*functio laesa*) (Dorland, 2010).

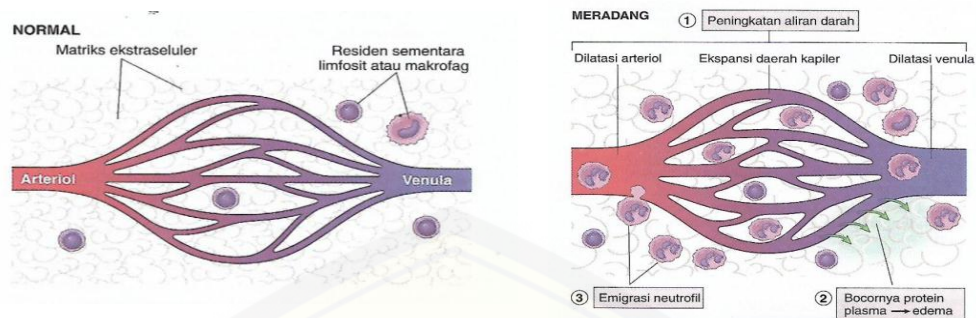
Tanpa proses inflamasi, infeksi dapat terus berlanjut tanpa terkendali dan luka tidak akan sembuh. Walaupun inflamasi dapat membantu menghilangkan infeksi dan memulai proses penyembuhan, reaksi inflamasi juga dapat

menimbulkan kerugian. Reaksi inflamasi yang mengeliminasi mikroba dan jaringan mati dapat mengakibatkan jejas pada jaringan yang normal. Oleh karena itu proses inflamasi bisa disertai dengan reaksi inflamasi yang normal dan terkoordinasi sehingga dapat menghilangkan penyebab jejas dan memulai proses penyembuhan, atau bisa juga menjadi reaksi inflamasi yang berlebihan (infeksi berat), berkepanjangan (agen penyebab jejas yang kebal eradikasi), atau tidak tepat (penyakit autoimun, alergi) (Kumar *et al.*, 2013).

Secara umum ada 2 tahapan dalam proses inflamasi yaitu:

a. Tahap vaskuler

Pada tahap vaskuler terjadi vasodilatasi yang akan meningkatkan aliran darah dan peningkatan permeabilitas vaskuler yang menyebabkan cairan kaya protein dan sel darah keluar ke jaringan ekstrasvaskular. Vasodilatasi yang terjadi pada reaksi vaskuler akan menyebabkan peningkatan aliran darah pada daerah yang cedera, sehingga akan memberi warna merah (*rubor*) dan rasa panas (*kalor*). Sedangkan peningkatan permeabilitas kapiler akan mengakibatkan cairan kaya protein yang harusnya berada di pembuluh darah keluar ke ekstrasvaskuler. Hal tersebut akan mengakibatkan tekanan osmotik cairan interstisium meningkat, sehingga lebih banyak air yang keluar dari darah ke dalam jaringan. Hasil akumulasi cairan ekstrasvaskuler yang terjadi akan menyebabkan edema jaringan (*tumor*). Saat proses inflamasi biasanya juga menimbulkan rasa nyeri (*dolor*) karena peregangan jaringan akibat timbulnya edema dan adanya pengeluaran mediator nyeri seperti prostaglandin, bradikinin, dan histamin yang dapat merangsang saraf perifer di sekitar jaringan yang mengalami inflamasi. Timbulnya edema dan rasa nyeri membuat keterbatasan gerak atau gangguan fungsi pada daerah sekitar inflamasi (*functio laesa*) (Kumar *et al.*, 2013).



Gambar 2.2 Manifestasi lokal utama pada peradangan akut dibandingkan dengan keadaan normal (sumber: Kumar *et al.*, 2013).

Gambar 2.2 menjelaskan perbedaan antara pembuluh darah jaringan normal dan jaringan yang mengalami peradangan, terlihat pembuluh darah pada jaringan yang mengalami peradangan terjadi vasodilatasi dan peningkatan permeabilitas vaskular sehingga menyebabkan neutrofil dan cairan protein plasma keluar dari pembuluh darah. Penumpukan cairan protein plasma (eksudat) pada ekstrasvaskuler akan menimbulkan edema.

b. Tahap seluler

Pada tahap seluler terjadi pengumpulan dan pengaktifan leukosit yang akan mengeliminasi agen berbahaya. Leukosit akan dikumpulkan dari darah ke ekstrasvaskuler di tempat terjadinya infeksi atau jaringan yang rusak. Urutan kejadian pengumpulan leukosit ke ekstrasvaskuler terdiri atas: (1) leukosit mengalami marginasi di sepanjang dinding pembuluh darah; (2) adhesi pada pembuluh darah (TNF- α dan IL-1 membantu meningkatkan adhesi polimorfonuklear neutrofil dan monosit); (3) transmigrasi ke ekstrasvaskuler secara *diapedesis*; (4) kemotaksis atau leukosit bergerak menuju tempat infeksi atau cedera akibat sinyal kimia (Kumar *et al.*, 2013).

Setelah leukosit terkumpul, leukosit harus diaktifkan untuk menjalankan fungsinya. Pengaktifan leukosit akan mengakibatkan peningkatan fungsi berikut:

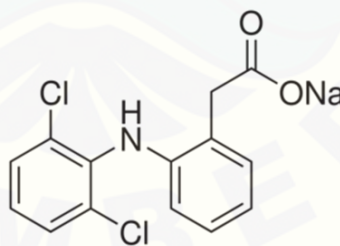
- a. Fagositosis
- b. Destruksi intrasel mikroba dan jaringan mati yang telah difagosit

- c. Produksi mediator inflamasi, termasuk asam arakidonat dan sitokin seperti IL-1, IL-6, dan TNF- α (Kumar *et al.*, 2013).

2.3 Natrium Diklofenak

2.3.1 Farmakodinamik

Natrium diklofenak adalah salah satu obat golongan NSAID yang merupakan derivat dari asam fenilasetat (Gambar 2.3). Natrium diklofenak merupakan inhibitor COX non-selektif (COX-1 dan COX-2) yang memiliki efek antiinflamasi, analgesik dan antipiretik. Mekanisme kerja obat tersebut adalah menghambat sintesis prostaglandin, prostasiklin dan tromboksan (Katzung, 2013). Pada tubuh manusia COX-1 merupakan komponen yang esensial karena berfungsi dalam pemeliharaan berbagai fungsi di berbagai jaringan khususnya saluran cerna, ginjal, serta trombosit. Aktivasi COX-1 menghasilkan tromboksan A_2 yang menyebabkan agregasi trombosit, vasokonstriksi, dan proliferasi otot polos dan prostasiklin yang bersifat sitoprotektif pada mukosa lambung. Sedangkan COX-2 diinduksi oleh berbagai stimulus inflamasi seperti sitokin, endotoksin, dan faktor pertumbuhan. Aktivasi COX-2 akan mensintesis prostasiklin yang ada di endotel makrovaskular. Prostasiklin yang disintesis oleh COX-2 bersifat kebalikan dengan tromboksan yang disintesis oleh COX-1 (Syarif, et al., 2012).

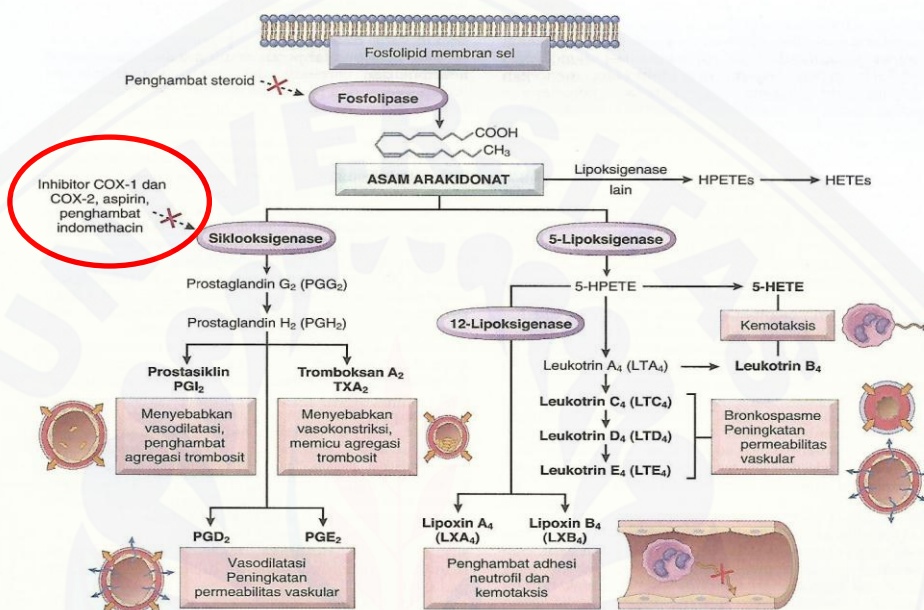


Gambar 2.3 Struktur kimia natrium diklofenak

2.3.2 Farmakokinetik

Natrium diklofenak cepat diabsorpsi melalui saluran cerna. Konsentrasi plasma puncak obat dicapai dalam 30 – 60 menit, berikatan dengan protein plasma sebesar 99,7% dan mengalami *first pass* sebesar 40-50%. Natrium diklofenak dimetabolisme di hati oleh enzim yang dihasilkan oleh sitokrom P450

(CYP2C9) menjadi 4-hidroksinatrium diklofenak. Hasil dari proses glukoronidase dan sulfasi diekskresi di urin dan empedu. Walaupun memiliki waktu paruh yang singkat yaitu 1-2 jam, natrium diklofenak diakumulasi di cairan sinovial sehingga efek terapi di sendi jauh lebih panjang daripada waktu paruh obat (Katzung *et al.*, 2013).



Gambar 2.4 Produksi metabolit asam arakidonat (sumber: Kumar *et al.*, 2013)

Gambar 2.4 menjelaskan tentang aktivitas enzim yang dapat menghambat hasil produksi metabolit asam arakidonat melalui intervensi farmakologik. Pada gambar tersebut juga menjelaskan mekanisme kerja obat golongan NSAID yang menghambat sintesis prostaglandin, prostasiklin maupun tromboksan dengan cara menghambat enzim siklooksigenase (COX).

2.3.3 Indikasi

Diklofenak sering digunakan untuk mengurangi rasa nyeri dan pembengkakan akibat inflamasi serta mengurangi kekakuan sendi karena artritis seperti reumatoid artritis, osteoartritis, gout artritis, dan lain-lain. Diklofenak juga dapat digunakan untuk mengurangi nyeri akut hingga sedang pada orang dengan dismenorea dan migrain (Katzung *et al.*, 2013).

2.3.4 Efek Samping

Secara umum diklofenak berpotensi menyebabkan efek samping pada organ saluran cerna, ginjal, dan hati. Efek samping yang sering terjadi adalah induksi tukak peptik (tukak duodenum dan tukak lambung) yang kadang disertai anemia sekunder karena perdarahan saluran cerna, sehingga pemakaian diklofenak pada pasien yang memiliki riwayat tukak lambung perlu dikombinasi dengan misoprostol atau omeprazol untuk melindungi mukosa lambung dari efek samping diklofenak. Diklofenak dengan dosis 150 mg/hari dapat mengganggu aliran darah ginjal dan laju filtrasi glomerulus. Selain itu, peningkatan aminotransferase serum lebih sering terjadi pada diklofenak dibanding NSAID yang lainnya (Katzung *et al.*, 2013).

2.4 Metode Uji Efektivitas Antiinflamasi

a. Metode pembuatan Eritema

Eritema merupakan salah satu tanda klasik inflamasi. Eritema terbentuk akibat iritasi sinar UV. Metode ini berdasarkan pengamatan visual terhadap eritema pada kulit hewan yang telah dicukur bulunya. Setengah dosis senyawa yang diujikan diberikan 30 menit sebelum pemaparan UV, setengah dosis berikutnya diberikan setelah 2 menit pemaparan UV. Kelemahan metode ini adalah eritema dapat dihambat oleh obat yang cara kerjanya tidak menghambat sintesis prostaglandin (Vogel *et al.*, 2002).

b. Metode Pembentukan Edema

Metode ini berdasarkan pengukuran volume edema yang terbentuk. Bahan yang digunakan untuk menginduksi edema yaitu ragi, telur, kaolin dan karagenin. Karagenin merupakan bahan penginduksi edema yang paling sering digunakan karena tidak merusak jaringan pada hewan uji (Morris, 2003). Kelebihan metode pembentukan edema menggunakan karagenin selain tidak merusak jaringan pada hewan uji, metode ini juga lebih mudah dalam pengukurannya karena menggunakan alat pletismometer, sehingga pengukurannya lebih akurat dan objektif (Necas *et al.*, 2013).

c. Metode Iritasi dengan Panas

Metode ini berdasarkan pengukuran luas inflamasi dan berat edema yang terbentuk setelah diiritasi dengan panas. Pertama-tama hewan uji diberi zat warna triptan biru yang disuntik secara intravena, zat ini akan berikatan dengan albumin plasma. Kemudian daerah injeksi dirangsang dengan panas yang cukup tinggi. Panas akan menyebabkan pelepasan histamin sehingga menimbulkan inflamasi. Zat warna akan keluar dari pembuluh darah yang mengalami vasodilatasi bersamaan dengan albumin plasma, sehingga jaringan yang mengalami inflamasi akan terlihat berwarna. Penilaian derajat inflamasi diketahui dengan mengukur luas daerah yang mengalami inflamasi akibat pelepasan zat warna ke jaringan yang inflamasi. Pengukuran juga dilakukan dengan menimbang edema yang terbentuk dengan cara memotong jaringan yang mengalami inflamasi (Vogel *et al.*, 2002).

d. Metode Nyeri

Ada beberapa metode yang digunakan untuk melihat efek nyeri pada hewan uji. Metode pertama adalah metode geliat, metode ini dilihat dari jumlah geliat yang terjadi pada hewan uji. Penginduksi pada metode geliat yaitu asam asetat yang diberikan secara intraperitoneal. Metode kedua adalah metode *paw licking test* yang diinduksi menggunakan formalin yang diinjeksikan pada permukaan kaki belakang hewan uji. Metode ini dilihat dari lamanya refleks menjilat pada kaki yang diinjeksi formalin. metode kedua ini memiliki dua fase nyeri, yaitu fase nyeri perifer dan sentral (Ahmad *et al.*, 2010).

e. Induksi Arthritis

Uji ini dilakukan dengan injeksi subkutan suspensi *Mycobacterium butyricum* pada daerah plantar kaki belakang. Arthritis ditentukan dengan mengukur beberapa parameter seperti edema kaki belakang yang diukur menggunakan pletismometer dan mengukur kekuatan fungsi cengkraman (*grip function strength*) dengan meletakkan tikus pada kawat yang diletakkan secara miring, setelah itu dilihat apakah tikus meluncur segera,

perlahan, atau bertahan dengan cara mencengkram kawat (Lende *et al.*, 2011).

2.5 Karagenin

Karagenin merupakan suatu mukopolisakarida yang diperoleh dari rumput laut merah Irlandia (*Chondrus crispus*). Karagenin telah digunakan di Irlandia sejak tahun 400 M sebagai pengental dan pengemulsi makanan. Selain untuk zat tambahan pada makanan, karagenin juga sering digunakan untuk pengujian zat-zat yang mempunyai efek antiinflamasi. Karagenin merupakan suatu zat asing (antigen) yang dapat merangsang pelepasan mediator proinflamasi seperti histamin, bradikinin, serotonin dan prostaglandin sehingga menimbulkan respons inflamasi akibat antibodi tubuh bereaksi terhadap antigen tersebut untuk melawan pengaruhnya jika masuk ke dalam tubuh. Berdasarkan kandungan sulfat dan potensi pembentukan gelnnya, karagenin dibagi menjadi tiga fraksi, yaitu kapaa karagenin, iota karagenin, dan lambda karagenin. Karagenin yang biasa digunakan pada uji efektivitas antiinflamasi suatu obat atau senyawa adalah lambda karagenin (Morris, 2003), karena lambda karagenin paling cepat menginduksi terjadinya inflamasi dan memiliki bentuk gel yang baik dan tidak keras (Rowe *et al.*, 2009).

Mekanisme pembentukan edema pada inflamasi akut yang diinduksi oleh karagenin adalah melalui perangsangan fosfolipid membran sel mast yang terdapat di jaringan ikat sekitar telapak kaki mencit untuk mengeluarkan asam arakidonat. Setelah itu asam arakidonat akan menghasilkan berbagai mediator proinflamasi dengan bantuan *Radical Oxygen Spesies* (Nuswantro, 2011). Edema yang ditimbulkan oleh karagenin akan berkembang cepat dan bertahan maksimal 6 jam setelah induksi dan berangsur berkurang dalam waktu 24 jam (Morris, 2003). Ada dua fase pembentukan edema yang diinduksi oleh karagenin, yaitu:

a. Fase awal

Fase awal terjadi 1-2 jam setelah injeksi karagenin. Histamin, serotonin dan bradikinin adalah mediator pertama yang terdeteksi pada fase awal peradangan yang disebabkan karagenin.

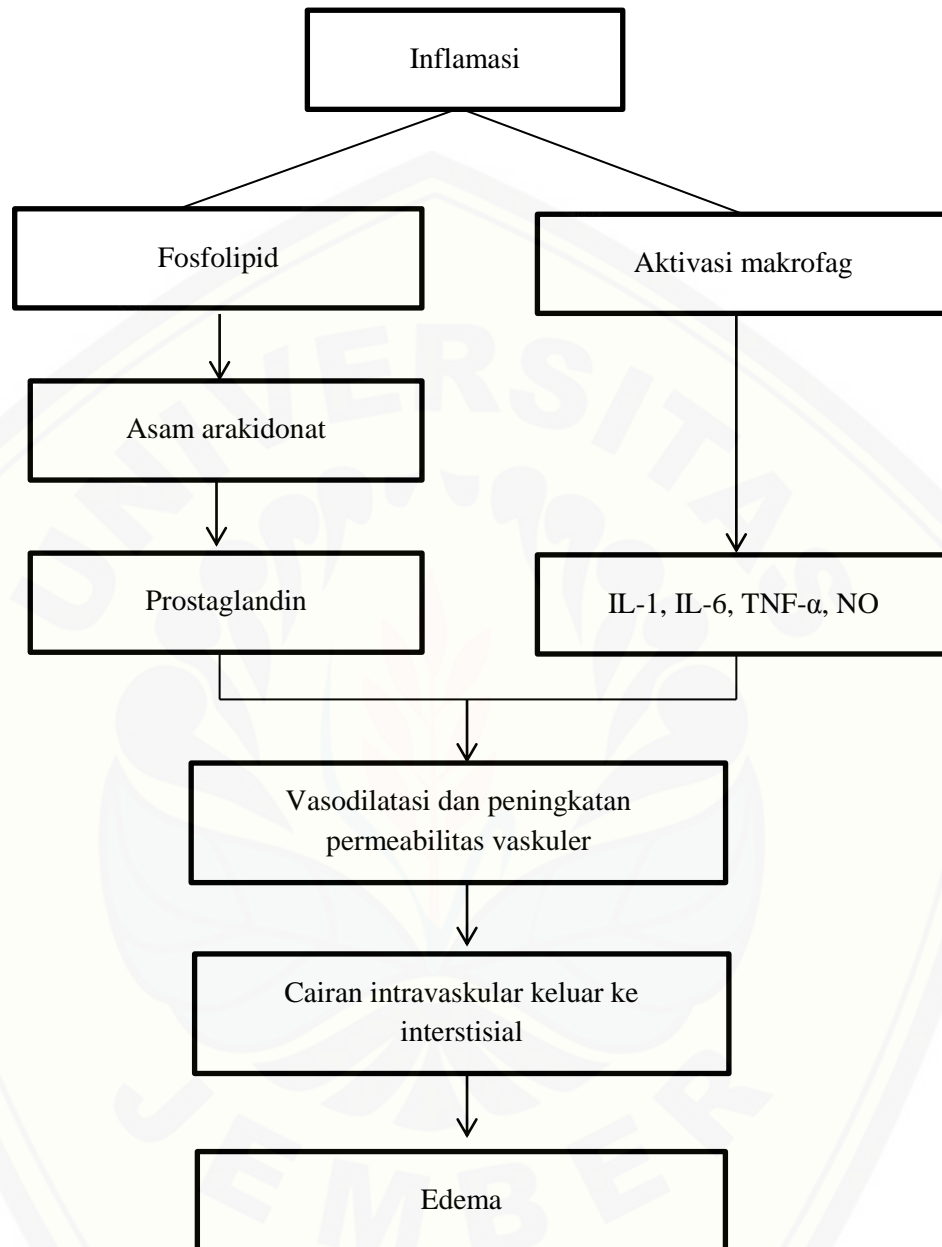
b. Fase lambat

Prostaglandin (PG) yang terlibat dalam peningkatan permeabilitas vaskular dapat terdeteksi pada 3 jam setelah induksi. Peradangan lokal dan / atau sistemik dikaitkan dengan peningkatan sitokin proinflamasi (seperti TNF- α , IL-1, dan IL-6) dan NO yang berkontribusi terhadap cedera jaringan, edema dan hiperalgesia (Necas *et al.*, 2013).

Edema yang terjadi pada fase awal tidak dapat dihambat oleh obat NSAID seperti indometasin atau aspirin. Sedangkan pada fase lambat, pembengkakan dikaitkan dengan peningkatan produksi prostaglandin dan induksi COX-2 pada kaki belakang, sehingga dapat dihambat oleh NSAID (Necas *et al.*, 2013).

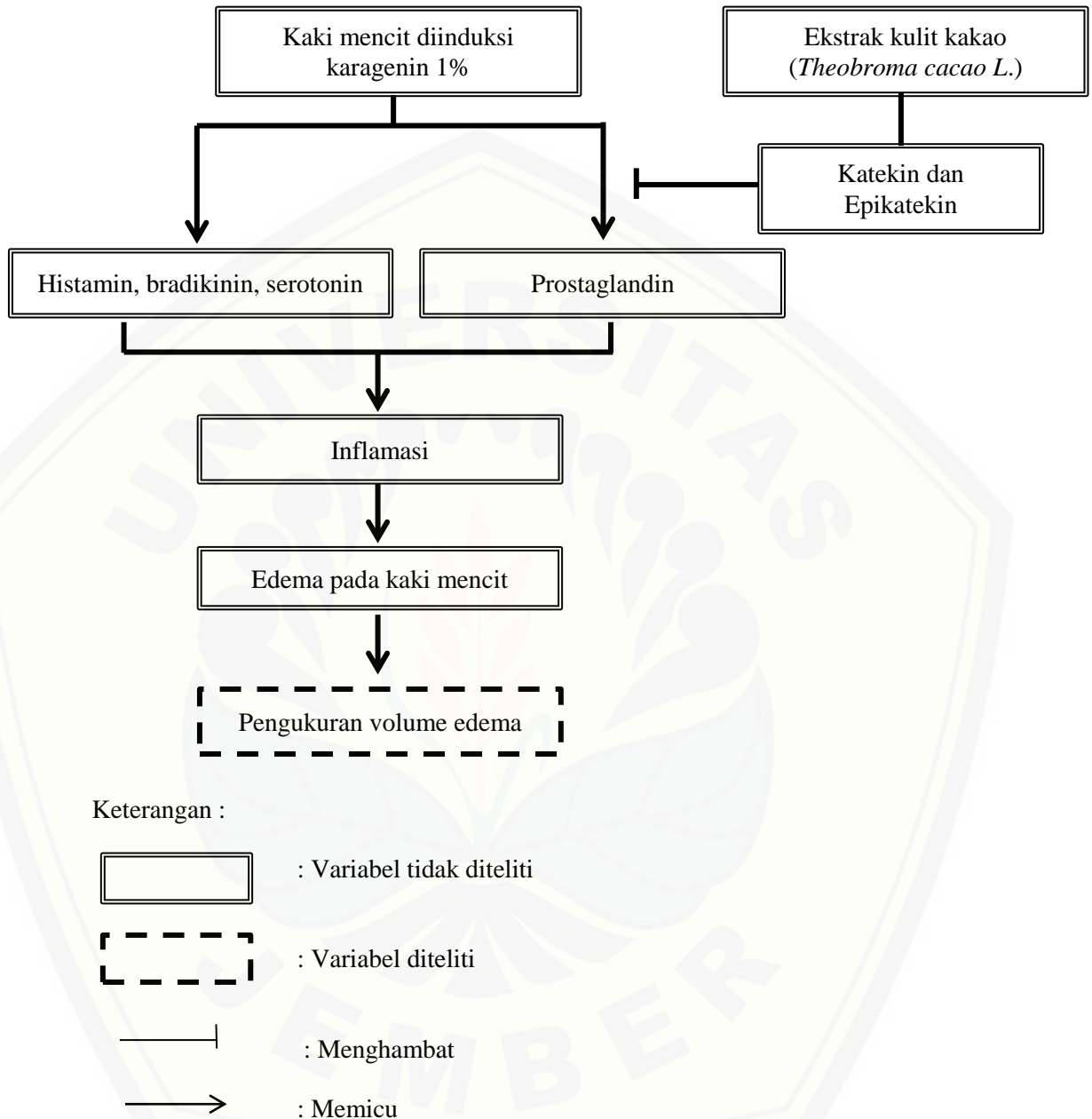


2.6 Kerangka Teori



Gambar 2.5 Kerangka Teori

2.7 Kerangka Konsep



Gambar 2.6 Kerangka Konsep

2.8 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah ekstrak kulit kakao (*Theobroma cacao L.*) dapat mengurangi volume edema pada kaki mencit yang diinduksi karagenin.

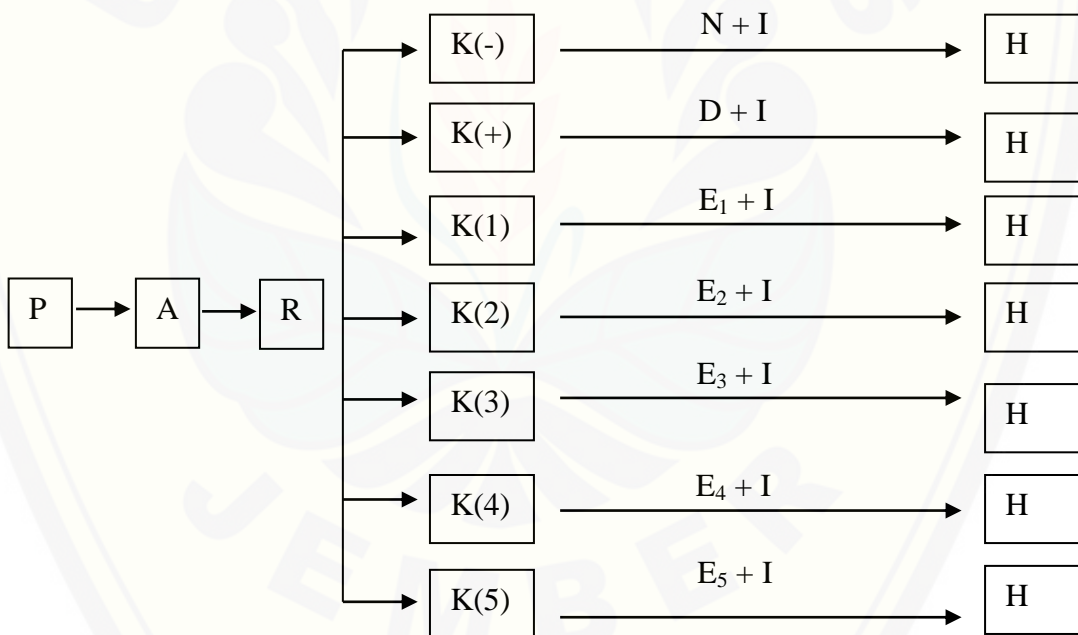
BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah *quasi experimental* dengan *post test only control group design*.

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah penelitian *post test only control group design*. Pada penelitian ini pemilihan hewan uji dilakukan secara acak dan terdapat 7 kelompok. Hasil penelitian dibandingkan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Secara sistematis rancangan penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian

Keterangan :

- P : Populasi
- A : Adaptasi
- R : Randomisasi
- K₍₋₎ : Kelompok kontrol negatif

- K₍₊₎ : Kelompok kontrol positif
K(1, 2, 3, 4, 5): Kelompok perlakuan (1, 2, 3, 4, dan 5)
E(1, 2, 3, 4, 5): Ekstrak kulit kakao dengan variasi dosis per oral (0,25 mg/gBB, 0,5 mg/gBB, 1 mg/gBB, 2 mg/gBB, dan 4 mg/gBB)
N : NaCMC 1% per oral
D : Natrium diklofenak 0,00448 mg/gBB per oral
I : Injeksi karagenin 0,05 ml 1% pada kaki mencit secara subplantar
H : Volume edema telapak kaki mencit

3.3 Populasi dan Sampel

Populasi pada penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*). Sampel penelitian ini diambil dari populasi yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

Kriteria inklusi sampel penelitian meliputi:

- Mencit berkelamin jantan
- Mencit dalam keadaan sehat (bergerak aktif)
- Usia 2-3 bulan dan berat 20-30 gram.

Sedangkan kriteria eksklusi pada penelitian ini meliputi:

- Mencit yang pernah digunakan penelitian
- Mencit yang mengalami infeksi sebelum perlakuan
- Mencit yang mati sebelum proses randomisasi.

Sampel yang digunakan pada penelitian ini diambil dengan teknik random sederhana (*simple random sampling*) dari populasi mencit yang kemudian akan dibagi menjadi 7 kelompok. Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini ditentukan berdasarkan rumus Federer, yaitu:

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

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

$$6r-6 \geq 15$$

$$6r \geq 21$$

$$r \geq 3,5$$

t = jumlah kelompok perlakuan

r = besar sampel tiap kelompok

Berdasarkan perhitungan di atas, besar sampel untuk masing-masing kelompok pada penelitian ini minimal 4 ekor. Jadi sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 28 ekor mencit yang terbagi dalam 7 kelompok dengan jumlah sama besar.

3.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di dua tempat, yaitu di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember untuk pemeliharaan dan perlakuan terhadap hewan coba dan Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Jember untuk pembuatan ekstrak kulit kakao. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober-November 2017.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak kulit kakao (*Theobroma cacao L.*).

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah daya antiinflamasi untuk mengurangi edema yang dilihat melalui penurunan volume edema telapak kaki mencit.

3.5.3 Variabel Terkendali:

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah:

- a. Usia hewan coba, usia mencit yang digunakan adalah sekitar 2-3 bulan.
- b. Jenis kelamin mencit, digunakan jantan karena relatif lebih kuat dan tidak terganggu oleh kehamilan.

- c. Berat badan mencit, yang digunakan adalah 20-30 gram karena merupakan berat badan ideal dengan ukuran yang kecil tetapi luas permukaan besar memudahkan mencit untuk beradaptasi.
- d. Pemeliharaan dan perlakuan mencit, di sebuah kandang beralaskan sekam kering. Pada kandang 7 kelompok hewan coba masing-masing berisi 4 ekor hewan coba.
- e. Dosis dan frekuensi pemberian karagenin.

3.6 Definisi Operasional

3.6.1 Ekstrak Kulit Kakao

Kulit kakao didapatkan dari PT. Perkebunan Nasional XII (PERSERO) Kebun Banjarsari, Kabupaten Jember akan dideterminasi oleh Fakultas Pertanian Universitas Jember. Surat determinasi tanaman dapat dilihat di Lampiran 3.1. Kulit kakao diekstraksi menggunakan aseton yang dicampur dengan aquades dengan perbandingan 50:50. Variasi dosis ekstrak kulit kakao yang diberikan pada penelitian ini adalah 0,25 mg/gBB, 0,5 mg/gBB, 1 mg/gBB, 2 mg/gBB, dan 4 mg/gBB yang dilarutkan dalam aquades. Pemberian ekstrak kulit kakao diberikan secara oral kepada mencit 30 menit sebelum injeksi 0,05 ml karagenin 1% pada kaki mencit secara subplantar.

3.6.2 Natrium Diklofenak

Natrium diklofenak yang dipakai pada penelitian ini adalah Natrium Diklofenak dosis 50 mg dalam sediaan tablet. Dosis natrium diklofenak yang digunakan pada penelitian untuk mencit 20 g adalah 0,00448 mg/gBB. Natrium diklofenak diberikan secara peroral dalam bentuk larutan yang dicampur dengan NaCMC 1% diberikan 30 menit sebelum injeksi 0,05 ml karagenin 1% pada kaki mencit secara subplantar (Nadia *et al.*, 2014).

3.6.3 *Sodium Carboxymethyl Cellulose* (NaCMC)

Sodium Carboxymethyl Cellulose merupakan serbuk yang berwarna putih sedikit kekuningan, tidak berbau, dan tidak berasa. *Sodium Carboxymethyl Cellulose* banyak digunakan pada formulasi farmasi sediaan oral ataupun topikal karena sifat bahan ini yang dapat mempertahankan kestabilan suspensi. NaCMC biasa digunakan pada emulsi dengan kadar 0,25 sampai 1 % (Rowe *et al.*, 2009). Dalam penelitian ini NaCMC 1% didapatkan dengan melarutkan 1 mg CMC dalam 100 ml air hangat.

3.6.4 Karagenin

Karagenin yang digunakan pada penelitian ini didapatkan dari Fakultas Farmasi. Karagenin yang sering digunakan untuk menguji aktivitas antiinflamasi pada suatu obat atau senyawa adalah lamda karagenin karena dapat menginduksi inflamasi akut tanpa menyebabkan kerusakan pada kaki hewan uji (Necas *et al.*, 2013).

3.6.5 Efektivitas antiinflamasi

Efektivitas antiinflamasi adalah kemampuan untuk mengurangi edema pada kaki hewan uji setelah injeksi karagenin subplantar. Pengurangan edema diukur dengan menghitung selisih volume telapak kaki sebelum injeksi karagenin dan 3 jam pasca injeksi karagenin menggunakan pletismometer digital. Efektivitas antiinflamasi dinyatakan dengan persen daya antiinflamasi (%).

3.7 Alat dan Bahan Penelitian

3.7.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah

- a. Alat untuk adaptasi dan pemilihan hewan coba adalah neraca elektrik, bak plastik, penutup kawat, tempat makan, botol minum, dan label.
- b. Alat untuk pembuatan ekstrak kakao adalah inkubator, *blender*, ayakan, timbangan, maserator, *waterbath* dan pengaduk/vortex, *centrifuge*.

- c. Alat untuk pemberian natrium diklofenak dan ekstrak kakao adalah *beaker glass*, pengaduk, spuit sonde, dan *handscoon*.
- d. Alat untuk injeksi karagenin adalah *beaker glass*, spuit ukuran 1ml, jarum ukuran 25 *gauge* dan *handscoon*.
- e. Alat untuk mengukur pengurangan edema pada kaki mencit adalah pletismometer digital.

3.7.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah

- a. Bahan untuk pemeliharaan mencit adalah makanan pelet, air, dan sekam.
- b. Bahan untuk obat antiinflamasi adalah natrium diklofenak 50mg dalam sediaan tablet.
- c. Bahan untuk ekstrak kakao adalah kulit kakao, aquades dan aseton.
- d. Bahan untuk perlakuan adalah karagenin 1%, natrium diklofenak 50 mg, larutan ekstrak kakao, aquades dan NaCMC 1 %.

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Uji Kelayakan Etik

Penelitian ini dilaksanakan setelah mendapatkan keterangan persetujuan etik dengan nomor 1.172/H25.1.11/KE/2017 yang dapat dilihat pada Lampiran 3.2.

3.8.2 Adaptasi Hewan Coba

Sebelum penelitian dimulai, mencit diadaptasikan terlebih dahulu selama 7 hari di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember untuk menyesuaikan dengan lingkungan. Makanan dan minuman diberikan secara *ad libitum* pada semua kandang.

3.8.3 Pemilihan Hewan Coba

Jumlah hewan coba adalah 28 ekor mencit (*Mus musculus*) dibagi menjadi 7 kelompok secara *simple random sampling* dengan kriteria *Mus musculus* jantan

dengan berat badan 20-30 gram, usia sekitar 2-3 bulan dan mencit dalam keadaan sehat (bergerak aktif).

3.8.4 Pembagian Kelompok Perlakuan

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

Tabel 3.1 Pembagian Kelompok Perlakuan

Nama Kelompok	Perlakuan yang Diberikan
Kelompok K ₍₋₎	Pemberian NaCMC 1% 30 menit sebelum injeksi karagenin
Kelompok K ₍₊₎	Pemberian natrium diklofenak 0,00448 mg/gBB 30 menit sebelum injeksi karagenin
Kelompok K ₍₁₎	Pemberian ekstrak kulit kakao 0,25mg/gBB 30 menit sebelum injeksi karagenin
Kelompok K ₍₂₎	Pemberian ekstrak kulit kakao 0,5mg/gBB 30 menit sebelum injeksi karagenin
Kelompok K ₍₃₎	Pemberian ekstrak kulit kakao 1 mg/gBB 30 menit sebelum injeksi karagenin
Kelompok K ₍₄₎	Pemberian ekstrak kulit kakao 2mg/gBB 30 menit sebelum injeksi karagenin
Kelompok K ₍₅₎	Pemberian ekstrak kulit kakao 4mg/gBB 30 menit sebelum injeksi karagenin

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

Pembuatan ekstrak kulit kakao dilakukan di laboratorium biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Kulit kakao 1,5 kg yang didapatkan dari PTPN XII (PERSERO) Kebun Banjarsari Kabupaten Jember dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran. Setelah itu kakao dipotong menjadi dua bagian dan biji dipisahkan dari kulitnya. Kulit kakao dipotong tipis-tipis lalu dikeringkan menggunakan inkubator dengan suhu 60⁰C. Kulit kakao yang sudah kering dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk. Serbuk yang didapat diayak menggunakan ayakan hingga didapatkan serbuk halus. Selanjutnya

serbuk kulit kakao dimaserasi menggunakan aseton/aquades 50/50 v/v selama 24 jam dengan sesekali diaduk. Volume pelarut yang digunakan untuk maserasi setiap 0,5 g serbuk halus kulit kakao kering adalah 5 ml aseton/aquades 50/50 v/v. Setelah filtrat didapatkan maka dilakukan evaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 60⁰C. Setelah itu dilakukan setrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 10 menit, supernatan yang didapat disimpan pada suhu -20⁰C (Kim *et al.*, 2003).

Dosis ekstrak biji kakao yang dapat menimbulkan efek antiinflamasi pada mencit adalah 0,5 mg/gBB (Andujar *et al.*, 2011). Untuk mendapatkan hasil kurva dosis terapi yang baik, sebaiknya digunakan lima dosis terapi. Sehingga variasi dosis ekstrak kulit kakao yang diberikan pada penelitian ini adalah 0,25 mg/gBB, 0,5 mg/gBB, 1 mg/gBB, 2 mg/gBB, dan 4 mg/gBB yang dilarutkan dalam NaCMC.

3.8.6 Perlakuan pada kelompok sampel

Penginduksian karagenin pada kaki mencit secara subplantar dilakukan setelah mencit diadaptasikan selama 7 hari. Pada penelitian ini digunakan 28 ekor mencit yang dibagi secara *simple random sampling* menjadi 7 kelompok perlakuan. Pada kelompok negatif diberikan 0,2 ml NaCMC 1%, kelompok positif diberikan 0,2 ml natrium diklofenak 0,00448 mg/gBB, dan 5 kelompok lainnya diberikan ekstrak kulit kakao dengan berbagai variasi dosis (0,25 mg/gBB, 0,5 mg/gBB, 1 mg/gBB, 2 mg/gBB, dan 4 mg/gBB) yang dilarutkan dalam NaCMC sampai 0,2 ml. Pemberian NaCMC 1%, natrium diklofenak, dan ekstrak kulit kakao diberikan secara per oral 30 menit sebelum injeksi 0,05 ml karagenin 1% pada kaki kiri belakang mencit secara subplantar. Induksi karagenin akan menimbulkan edema pada telapak kaki mencit. Protokol atau standar injeksi karagenin dapat dilihat pada Lampiran 3.3.

Pengukuran volume edema telapak kaki mencit yang telah diinduksi karagenin diukur menggunakan pletismometer digital. Pletismometer digital adalah alat yang dirancang untuk mengukur perubahan kecil dalam volume. Prinsip pengukuran berdasarkan hukum *Archimedes* yaitu benda yang dimasukkan

ke dalam zat cair akan memberikan gaya atau tekanan ke atas sebesar volume yang dipindahkan. Sebelum pengukuran volume edema telapak kaki mencit, maleolus lateral kaki mencit ditandai menggunakan spidol permanen dahulu untuk mempermudah pengukuran berulang. Volume edema kaki mencit yang terbentuk akibat injeksi karagenin kemudian diukur dengan pletismometer digital sebanyak 2 kali, yaitu sebelum injeksi karagenin dan 3 jam setelahnya.



Gambar 3.2 Pletismometer digital

3.8.7 Perhitungan % Daya Antiinflamasi

Metode Langford yang telah dimodifikasi digunakan untuk mengetahui efek antiinflamasi (Hidayat, 2010), yang dihitung dalam persen (%) daya antiinflamasi dengan rumus sebagai berikut.

$$\% \text{ daya antiinflamasi} = \frac{N - U}{N} \times 100\%$$

Keterangan :

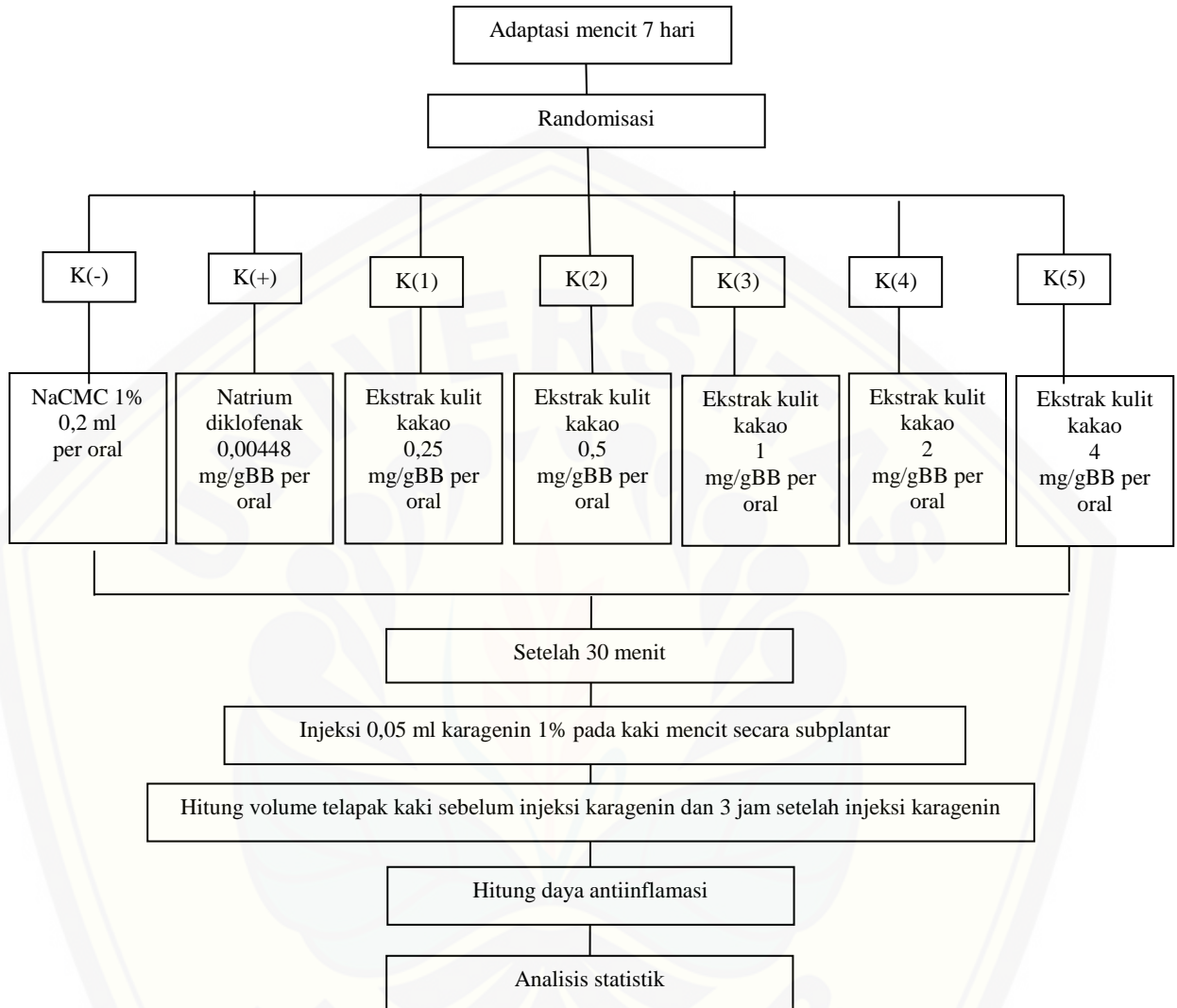
N = nilai rata-rata edema telapak kaki mencit kelompok kontrol negatif setelah injeksi karagenin – sebelum injeksi karagenin.

U = nilai rata-rata volume edema telapak kaki mencit kelompok uji setelah injeksi karagenin – sebelum injeksi karagenin.

3.9 Analisis Data

Seluruh data dianalisis secara komputersasi dan menggunakan *software* SPSS. Sebelum dilakukan uji statistik, dilakukan uji normalitas data dengan menggunakan uji *Shapiro Wilk* karena jumlah sampel <50 dan uji homogenitas menggunakan *Levene's test*. Apabila data yang didapatkan terdistribusi normal dan homogen, maka dilanjutkan dengan uji *One Way Anova* ($p < 0.05$). Apabila data yang didapatkan terdistribusi tidak normal dan tidak homogen, maka dilanjutkan dengan uji *Kruskal-Wallis* ($p < 0.05$). Setelah dilakukan uji signifikansi dan didapatkan hasil yang signifikan ($p < 0,05$), dilakukan analisis *Post hoc* untuk mengetahui kelompok mana saja yang mempunyai perbedaan signifikan. Tingkat kepercayaan yang digunakan pada penelitian ini adalah 95% atau nilai signifikansinya sebesar $p = 0,05$.

3.10 Alur Penelitian



Gambar 3.3 Skema dan alur penelitian

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari hasil penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Ekstrak kulit kakao memiliki efek antiinflamasi yang dilihat dari adanya pengurangan volume edema telapak kaki mencit yang diinduksi karagenin.
2. Ekstrak kulit kakao dengan dosis 0,25 mg/gBB, 0,5 mg/gBB, 1 mg/gBB, 2 mg/gBB dan 4 mg/gBB memiliki persentase daya antiinflamasi secara berturut-turut sebesar 19,69%, 27,27%, 31,82%, 36,36%, dan 36,36%.
3. Persentase daya antiinflamasi natrium diklofenak sebesar 51,52%. Persentase daya antiinflamasi tersebut memiliki persentase yang lebih tinggi dibandingkan dengan persentase daya antiinflamasi semua dosis ekstrak kulit kakao yang diberikan.

5.2 Saran

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

1. Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai efek antiinflamasi ekstrak kulit kakao bila dikombinasi dengan obat NSAID.
2. Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai pemanfaatan potensi antiinflamasi ekstrak kulit kakao dengan menggunakan isolasi zat aktif maupun fraksinasi ekstrak.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, N. S., Akbar, W., Muhammad, F., dan Aisha, Q. 2010. Analgesic and anti-inflammatory effects of *Pistacia integerrima* extracts in mice. *Elsevier*. 129(2): 250-253.
- AGA. 2014. AGA Launches Exciting New Medicine Safety Campaign. http://www.gastro.org/news_items/2014/2/20/aga-launches-exciting-new-medicine-safety-campaign/. [Diakses pada 1 November 2017].
- Andujar, I., Recio, M. C., Giner, R. M., Jovellanos, E. C., Laghi, S., Muguerza, B., dan Rios, J. L. 2011. Inhibition of Ulcerative Colitis in Mice After Oral Administration of Polyphenol-Enriched Cocoa Extract is Mediated by the Inhibition of STAT1 and STAT3 Phosphorylation in Collon Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59: 647-6483.
- Arlorio, M., Coisson, J.D., Travaglia, F., Varsaldi, F., Miglio, G., Lombardi, G., dan Martelli, A. 2005. Antioxidant and Biological Activity of Phenolic Pigments from *Theobroma Cacao* Hulls Extracted With Supercritical CO₂. *Food Research International*. 38: 1009-1014.
- Cooper, K. A., Donovan, J. L., Waterhouse, A. L., dan Williamsons, G. 2008. Cocoa and Health: A Decade of Research. *Br J Nutr*. 99(1) : 1-11.
- Corwin, E. J. 2009. *Buku Saku Patofisiologi Edisi 3*. Jakarta: EGC.
- De Jongh, R. F., Vissers, K. C., Meert, T. F., Booji, L. H., De Deyne, C. S., dan Heylen, R. J. 2003. The Role of Interleukin-6 in Nociception and Pain. *Pubmed*. 96: 1096-1103.
- Dinarello, C. A. 2010. Anti-inflammatory Agents: Present and Future. *Science Direct*. 140(6): 935-950.
- Diyantika, D. 2012. Perubahan Morfologi *Staphilococcus aureus* Akibat Paparan Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cacao L.*) secara in Vitro. *Skripsi*. Jember: Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
- Dorland, W. A. 2010. *Dorland's Pocket Medical Dictionary*. Thirty One Edition. Michigan: Elsevier. Terjemahan oleh Albertus Agung Mohede. 2012. *Kamus Kedokteran Dorland Edisi 3*. Jakarta: EGC.
- Erlejman, A.G., Jaggars, G., Fraga, C.G., dan Oteiza, P.I. 2008. TNF- α -induced NF-B Activation and Cell Oxidant Production are Modulated by Hexameric Procyanidins in Caco-2 cells. *Pubmed*. 476:186–195.

- Fapohunda, S. O., dan Afoloyan, A. 2012. Fermentation of Cocoa Beans and Antimicrobial Potentials of the Pod Husk Phytochemicals. *Journal of Physiology and Pharmacology Advances*. 2(3): 158-262.
- Goya, L., Martin, M. A., Sarria, B., Ramos, S., Mateos, R., dan Bravp, L., 2016. Effect of Cocoa and Its Flavonoids on Biomarkers of Inflammation: Studies of Cell Culture, Animals and Human. *Nutrients Journal*. 212(8).
- Guyton , A. C. & Hall, J. E. 2006. *Textbook of Medical Physiology*. Eleventh Edition. Terjemahan oleh Irawati, D., Ramadani, F., Indriyani, F., Dany, I., Nuryanto, S. S. P., Rianti, T., Resmisari, Suyono, Y. J. 2012. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Halvorsen, B. L., Carlsen, M. H., Phillips, K. M., Bohn, S. K., Holte, K., Jacobs, D. R. J., dan Blomhoff, R. 2006. Content of redox-active compounds (i.e., antioxidants) in foods consumed in the United States. *Am. J. Clin. Nutr.* 84(1) : 95–135.
- Hapsari, M., Purwanti, T., dan Rosita, N. 2012. Penetrasi Natrium Diklofenak Sistem Niosom Span 20 – Kolesterol dalam Basis Gel HPMC 4000. *PharmaScientia*. 1(2): 20-32.
- Hidayat, R. 2010. Efek Analgesik dan Anti Inflamasi Jus Buah Nanas (*Ananas comosus L.*) pada Mencit Betina Galur Swiss. *Skripsi*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma.
- Hidayati, Candra Dewi. 2013. Aktivitas Antibakteri dan Bioautografi Ekstrak Aseton Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao L.*) terhadap *Streptococcus mutans* dan *Eschericia coli*. *Skripsi*. Surakarta: Fakultas farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- International Trade Statistic. 2012. *Medicinal Plants and Extracts*. www.intracen.org/tradstat/. [Diakses pada 1 juni 2017].
- Katzung, B. G. 2013. *Farmakologi Dasar dan Klinik Edisi 12*. Jakarta: EGC.
- Kayaputri, I. L., Debby, M. S., Djali, M., Rossi, I., Dita, L. D. 2014. Kajian Fitokimia Ekstrak Kulit Biji Kakao (*Theobroma cacao L.*). *Chimica et Natura Acta*. 2(1): 83-90.
- Kim, K. H., Lee, K. W., Kim, D. Y., Park, H. H., Kwon, I. B., dan Lee, H. J. 2003. Extraction and Fractionation of Glucosyltransferase Inhibitors from Cacao Bean Husk. *Elsevier*. 39(2004): 2043-2046.

- Kim, T. H., Jeon, E. J., Cheung, D. Y., dan Kim, S. S. 2013. Gastroprotective Effects of Grape Seed Proanthocyanidin Extracts Against Nonsteroid Anti-Inflammatory Drug-Induced Gastric Injury in Rats. *NCBI*. 7(3): 282-289.
- Kumar V, Cotran R. S., dan Robbins S. L. 2013. *Buku Ajar Patologi Robbins*. Edisi 9. Alih bahasa oleh Brahm U Pendit. Jakarta: EGC.
- Kumari, I.P.N.P. dan Abeysinghe, D.C. 2011. Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Beans, Bean Husks, and Pod Husks of Cocoa (*Theobroma cacao L.*). *Proceedings of 11th Agricultural Research Symposium*. 362-366.
- Lacaille, D., Guh, D. P., Abrahamowicz, M., Anis, A. H., dan Esdaile, J. M. 2008. Use of Nonbiologic Disease-Modifying Antirheumatic Drugs and Risk of Infection in Patients With Rheumatoid Arthritis. *PubMed*. 59(8): 1074-1081.
- Lazzarini, R., Maiorka, P. C., Liu, J., Papadopoulos, V., dan Neto, J. P. 2006. Diazepam Effects on Carrageenan-induced Inflammatory Paw Edema in Rats: Role of nitric oxide. *Elsevier*. 78(2006): 3027-3034.
- Lee, K. W., Kim, Y. J., Lee, H. J., dan Lee, C. Y. 2003. Cocoa has More Phenolic Phytochemicals and Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 7292-7295.
- Lende, A. B., Ajay, D. K., Avinash, D. D., Millind, M. M., Rajesh, R. P., Pallavi, A. B., dan Suresh, R. N. 2011. Anti-inflammatory and Analgesic Activity of Protocatechuic Acid in Rats and Mice. *Springer*. 19: 255-263.
- Maria, J. C., Ximena, W., Catalina, C. P., dan Martin, G. 2017. The Gastrointestinal Tract as a Key Target Organ for the Health-Promoting Effects of Dietary Proanthocyanidins. *Frontiers in nutrition*. 3(57).
- Marlicz, W., Loniewski, I., Grimes, D. S., dan Quigley, E. M. 2014. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs, Proton Pump Inhibitors, and Gastrointestinal Injury: Contrasting Interactions in the Stomach and Small Intestine. *Elsevier*. 12 (89): 1699-1709.
- Moreira, L. Q., Vilela, F. C., Orlandi, L., Dias, D. F., Santos, A. L. A., Silva, M. A., Paiva, R., Silva, G. A., dan Paiva, A. G. 2011. Anti-inflammatory Effect of Extract and Fractions from the Leaves of *Byrsonima Intermedia* A. Juss. in Rats. *Elsevier*. 138(2): 610-616.
- Morris, C. J. 2003. Carrageenan-Induced Paw Edema in the Rat and Mouse. *Pubmed*. 225: 115-121.

- Nadia, A. K., Eman, M. A., Khaled, O. M., dan Yassin, M. N. 2014. Synthesis and Biological Evaluation of New Pyrazolone–Pyridazine Conjugates as Anti-Inflammatory and Analgesic Agents. *Science Direct*. 22(7): 2080–2089
- Necas, J. dan Bartosikova, L. 2013. Carrageenan: a review. *Veterinari Medicina*. 58(4): 187-205.
- Nurbahar, I. R. 2014. *Statistik Perkebunan Indonesia*. Jakarta: Direktorat Jendral Perkebunan.
- Nuswantoro, O. P. 2011. Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Etanol Daun Suji (*Pleomele Angustifolia*) pada Tikus Putih. *Skripsi*. Purwokerto: Universitas Jendral Sudirman.
- Othman, A., Ismail A., Ghani N.A., dan Adenan I., 2007. Antioxidant Capacity and Phenolic Content of Cocoa Beans, *Journal Food Chemistry*. 100(4): 1523-1530.
- Panganiban, C. A., Reyes, R. B., Agojo, I., Armedilla, R., dan Esteba, L., 2012. Antibacterial Activity of Cacao (*Theobroma cacao L.*) Pulp Crude Extract Against Selected Bacterial Isolates. *International Peer Reviewed Journal*. 1: 32-44.
- Panjaitan, E., Didik, I., Edhi, M., dan Junun S. 2015. Sebuah Dilema Pertanian Organik Terkait Emisi Metan. *Jurnal Manusia dan Lingkungan*. 22(1): 66-72.
- Parsaeyan, N., Khosravi, H. M., Absalan, A., dan Mozaya, M. R. 2014. Beneficial Effects of Cocoa on Lipid Peroxidation and Inflammatory Markers in Type 2 Diabetic Patients and Investigation of Probable Interactions of Cocoa Active Ingredients with Prostaglandin Synthase-2 (PTGS-2/COX-2) Using Virtual Analysis. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*. 13(1): 30-39.
- Perez, B. T., Ramirez, S. C., Franch, A., Ramos, R. S., Castellote, C., Perez, C. F. J., dan Castell, M. 2012. Effects of a Cocoa Diet on an Intestinal Inflammation Model in Rats. *NCBI*. 237: 1181-1188.
- Price S. A. dan L. M. Wilson. 2012. *Pathophysiology: Clinical Concepts of Disease Processes*. Six Edition. Michigan: Elsevier. Terjemahan oleh B. U. Pendit, H. Hartanto, P. Wulansari, dan D. A. Mahanani. 2012. *Patofisiologi: Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit Volume 1 Edisi Enam*. Jakarta: EGC.
- Rambat, Aprilita, N. H., dan Rusdiarso, B. 2015. Aplikasi Limbah Kulit Buah Kakao sebagai Media Fermentasi Asam Laktat untuk Bahan Baku Bioplastik. *Ejournal Kemenperin*.

- Ramiro, P. E., dan Castell, M. 2009. Cocoa: Antioxidant and Immunomodulator. *Br J Nutr.* 101(7): 931-940.
- Ramiro I.R., Ramos S., Oliva E. L., Torres A. A., Bravo L., Goya L., dan Martín M. A. 2013. Cocoa Polyphenols Prevent Inflammation in the Colon of 2 Azoxymethane-Treated Rats and in TNF-stimulated Caco-2 cells. *Br. J. Nutr.* 110: 206–215.
- Rowe, R. C., Sheskey, P. J., dan Quinn, M. E. 2009. *Handbook of Pharmaceutical Expients, 6th ed.* London : Pharmaceutical Press.
- Sartini, Djide, Natsir, M., dan Alam, G. 2011. Ekstraksi Komponen Bioaktif dari Limbah Kulit Buah Kakao dan Pengaruhnya terhadap Aktivitas Antioksidan dan Antimikroba. *Journal of Traditional Medicine.* 14(47).
- Sidhapuriwala, J., Li, L., Sparatore, A., Bhatia, M., dan Moore, P. K. 2007. Effect of S-diclofenac, a Novel Hydrogen Sulfide Releasing Derivative, on Carrageenan-induced Hindpaw Oedema Formation in the Rat. *Elsevier.* 569: 149-154.
- Syarif, A., Gunawan, S. G., Nafrialdi, R. S., dan Elysabeth. 2012. *Farmakologi dan Terapi Edisi 5 Cetak Ulang Dengan Tambahan.* Jakarta: Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Tamaddonfard, E., Farshid, A. A., Eghdami, K., Samadi, F., dan Erfanparast, A. 2013. Comparison of the Effects of Crocin, Safranal and Diclofenac on Local Inflammation and Inflammatory Pain Responses Induced by Carrageenan in Rats. *Science Direct.* 65(5) : 1272-1280.
- Tarek A. A. E., Randa H. M., Heba F. P., dan Hisham R. A. Z. 2011. Catechin Protects Against Oxidative Stress and Inflammatory-Mediated Cardiotoxicity in Adriamycin-Treated Rats. *Springer.* 12:233–240.
- Undare, S. S., Valekar, N. J., Patravale, A. A., Jamale, D. K., dan Vibhute, S. S. 2016. Synthesis, Anti-inflammatory, Ulcerogenic and Cyclooxygenase Activities of Indenopyrimidine Derivatives. *Elsevier.* 26 (3) : 814-818.
- Vogel, H. G., dan Vogel, W. H. 2002. *Drug Discovery and Evaluation Pharmacological Assay.* Springer.
- Wahyudi, T., Panggabean, T.R., dan Pujiyanto. 2008. *Panduan Lengkap Kakao.* Jakarta: Penebar Swadaya.
- Wang, Y., Chen, P., Changyun, T., Yazhen, L., dan Zhang, H. 2013. Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of Extract and Two Isolated Flavonoids of *Carthamus tinctorius* L. *Elsevier.* 151: 944-950.

Lampiran 3.1 Determinasi Tanaman Kakao (*Theobroma cacao L.*)**KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS PERTANIAN**

Jl. Kalimantan Kampus Tegalboto, Jember 68121; Telp.: (0331) 334054, 339596
Fax.: (0331) 338422, e-mail: admin.faperta@unej.ac.id

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

10 Oktober 2017

Yth. : **Wakil DEKAN I**
Fakultas Kedokteran
Universitas Jember

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

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

Atas kepercayaannya disampaikan terimakasih.

Wakil Dekan II,

Ir. Soedradjad, M.T.
95707181984031001

Tembusan:

1. Mahasiswa yang bersangkutan

HASIL IDENTIFIKASI MORFOLOGIS CONTOH TUMBUHAN

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

Kesimpulan:

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



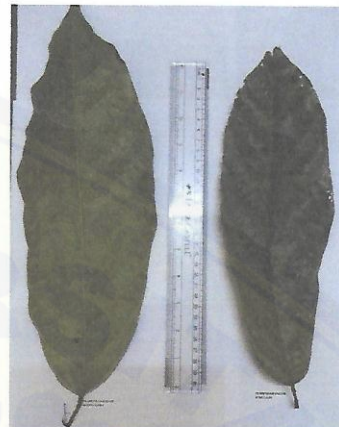
Jember, 10 Oktober 2017
Pelaksana Identifikasi
PLP Laboratorium Agronomi,

Muhammad Sugiono
NIP. 196712182001121001

Tanaman yang di Identifikasi



Susunan Daun pada Tangkai



Permukaan bagian Bawah (kiri) dan Atas (kanan)

DAUN TANAMAN



Buah



Buah dan Biji




Biji

BUAH DAN BIJI

Jember, 10 Oktober 2017
Pelaksana Identifikasi
PLP Laboratorium Agronomi,




Muhammad Sugiono
NIP. 196712182001121001

Lampiran 3.2 Etik Penelitian



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI

UNIVERSITAS JEMBER

KOMISI ETIK PENELITIAN

Jl. Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877 Jember 68121 – Email :
fk_unej@telkom.net**KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK***ETHICAL APPROVA*

Nomor : 1.472 /H25.1.11/KE/2017

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

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

UJI EFEKTIVITAS ANTI INFLAMASI EKSTRAK KULIT KAKAO (*Theobroma cacao* L.) TERHADAP VOLUME EDEMA KAKI MENCIT YANG DIINDUKSI KARAGENIN

Nama Peneliti Utama : Faradila Praginta Syaputri
Name of the principal investigator

NIM : 142010101089

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Name of institution

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

Jember, 20 Oktober 2017
Ketua Komisi Etik Penelitian



Rini Prasanti, Sp.PK

Tanggapan Anggota Komisi Etik

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

Review Proposal :

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

Mengetahui
Ketua Komisi Etik Penelitian



dr. Rini Kiyanti, Sp.PK

Jember, 10 Oktober 2017

Reviewer

dr. Desie Dwi Wisudanti, M.Biomed

Lampiran 3.3 Protokol Perlakuan

1. Protokol Sonde

Tujuan : untuk memasukkan obat atau ekstrak secara per oral

Alat dan bahan :

- a. Alat : Sduit sonde
- b. Bahan : NaCMC, Natrium diklofenak dan ekstrak kulit kakao

Metode :

- a. Menarik kulit pada bagian tengkuk mencit dengan jari tangan dan ibu jari tangan kiri lalu membalikkan tubuh mencit sehingga menghadap ke kita.
- b. Pemberian obat dilakukan menggunakan jarum suntik yang ujungnya telah dimodifikasi menjadi tumpul. Ketika obat akan dimasukkan secara per oral pastikan posisi kepala menghadah atau posisi dagu sejajar dengan tubuh dan mulut terbuka sedikit. Tekan suntik secara perlahan untuk mengeluarkan obat, jika terjadi tahanan kemungkinan yang terjadi adalah jarum suntik salah jalur ke jalur pernapasan, sehingga jarum suntik perlu diangkat sedikit untuk masuk ke jalur pencernaan.

2. Protokol Injeksi Karagenin secara subplantar / subkutan

Tujuan : untuk menginduksi edema pada mencit secara subplantar

Alat dan bahan :

- a. Alat : Sduit ukuran 1 mL
- b. Bahan : Karagenin lambda 1%

Metode :

- a. Maleolus lateral kaki kiri bagian belakang hewan uji ditandai dengan spidol permanen untuk mempermudah pengukuran yang berulang.
- b. Pengukuran dilakukan dua kali yaitu sebelum injeksi karagenin dan 3 jam setelah injeksi karagenin.
- c. Pemberian senyawa uji diberikan 30 menit sebelum injeksi karagenin.
- d. Sebanyak 0,05 ml lambda karagenin 1% diinjeksikan secara subkutan pada daerah plantar kaki kiri belakang hewan uji menggunakan spuit berukuran 1 ml. Tempat injeksi terletak dekat dengan pusat plantar atau telapak kaki mencit.

Lampiran 4.1 Hasil Analisis Statistik

Uji Normalitas Volume Edema

Tests of Normality

	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Edema	Kelompok (-)	,151	4	.	,993	4	,972
	Kelompok (+)	,283	4	.	,863	4	,272
	Kelompok (1)	,329	4	.	,895	4	,406
	Kelompok (2)	,250	4	.	,945	4	,683
	Kelompok (3)	,283	4	.	,863	4	,272
	Kelompok (4)	,151	4	.	,993	4	,972
	Kelompok (5)	,151	4	.	,993	4	,972

a. Lilliefors Significance Correction

Uji Varians Data Volume Edema

Test of Homogeneity of Variances

Edema

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,439	6	21	,844

Uji One Way Anova

Descriptives

Edema

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
Kelompok (-)	4	,1650	,01291	,00645	,1445	,1855	,15
Kelompok (+)	4	,0775	,00957	,00479	,0623	,0927	,07

Kelompok (1)	4	,1325	,01258	,00629	,1125	,1525	,12
Kelompok (2)	4	,1200	,00816	,00408	,1070	,1330	,11
Kelompok (3)	4	,1125	,00957	,00479	,0973	,1277	,10
Kelompok (4)	4	,1050	,01291	,00645	,0845	,1255	,09
Kelompok (5)	4	,1050	,01291	,00645	,0845	,1255	,09
Total	28	,1168	,02749	,00520	,1061	,1274	,07

ANOVA

Edema

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,018	6	,003	22,716	,000
Within Groups	,003	21	,000		
Total	,020	27			

Uji Post Hoc *LSD*

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Edema

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kelompok (-)	Kelompok (+)	,08750*	,00805	,000	,0707	,1043
	Kelompok (1)	,03250*	,00805	,001	,0157	,0493
	Kelompok (2)	,04500*	,00805	,000	,0282	,0618
	Kelompok (3)	,05250*	,00805	,000	,0357	,0693
	Kelompok (4)	,06000*	,00805	,000	,0432	,0768
	Kelompok (5)	,06000*	,00805	,000	,0432	,0768
Kelompok (+)	Kelompok (-)	-,08750*	,00805	,000	-,1043	-,0707
	Kelompok (1)	-,05500*	,00805	,000	-,0718	-,0382
	Kelompok (2)	-,04250*	,00805	,000	-,0593	-,0257
	Kelompok (3)	-,03500*	,00805	,000	-,0518	-,0182
	Kelompok (4)	-,02750*	,00805	,003	-,0443	-,0107

	Kelompok (5)	-,02750*	,00805	,003	-,0443	-,0107
Kelompok (1)	Kelompok (-)	-,03250*	,00805	,001	-,0493	-,0157
	Kelompok (+)	,05500*	,00805	,000	,0382	,0718
	Kelompok (2)	,01250	,00805	,136	-,0043	,0293
	Kelompok (3)	,02000*	,00805	,022	,0032	,0368
	Kelompok (4)	,02750*	,00805	,003	,0107	,0443
	Kelompok (5)	,02750*	,00805	,003	,0107	,0443
Kelompok (2)	Kelompok (-)	-,04500*	,00805	,000	-,0618	-,0282
	Kelompok (+)	,04250*	,00805	,000	,0257	,0593
	Kelompok (1)	-,01250	,00805	,136	-,0293	,0043
	Kelompok (3)	,00750	,00805	,362	-,0093	,0243
	Kelompok (4)	,01500	,00805	,077	-,0018	,0318
	Kelompok (5)	,01500	,00805	,077	-,0018	,0318
Kelompok (3)	Kelompok (-)	-,05250*	,00805	,000	-,0693	-,0357
	Kelompok (+)	,03500*	,00805	,000	,0182	,0518
	Kelompok (1)	-,02000*	,00805	,022	-,0368	-,0032
	Kelompok (2)	-,00750	,00805	,362	-,0243	,0093
	Kelompok (4)	,00750	,00805	,362	-,0093	,0243
	Kelompok (5)	,00750	,00805	,362	-,0093	,0243
Kelompok (4)	Kelompok (-)	-,06000*	,00805	,000	-,0768	-,0432
	Kelompok (+)	,02750*	,00805	,003	,0107	,0443
	Kelompok (1)	-,02750*	,00805	,003	-,0443	-,0107
	Kelompok (2)	-,01500	,00805	,077	-,0318	,0018
	Kelompok (3)	-,00750	,00805	,362	-,0243	,0093
	Kelompok (5)	,00000	,00805	1,000	-,0168	,0168
Kelompok (5)	Kelompok (-)	-,06000*	,00805	,000	-,0768	-,0432
	Kelompok (+)	,02750*	,00805	,003	,0107	,0443
	Kelompok (1)	-,02750*	,00805	,003	-,0443	-,0107
	Kelompok (2)	-,01500	,00805	,077	-,0318	,0018
	Kelompok (3)	-,00750	,00805	,362	-,0243	,0093
	Kelompok (4)	,00000	,00805	1,000	-,0168	,0168

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

Lampiran 4.2 Dokumentasi

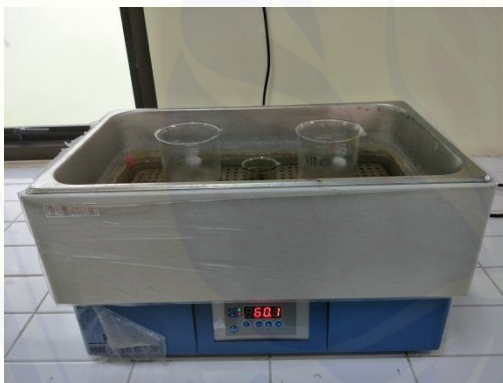
Pembuatan Ekstrak Kulit Kakao



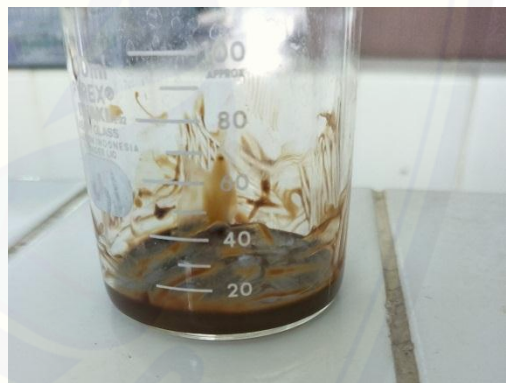
Pemotongan kulit kakao



Pembuatan serbuk halus kulit kakao



Proses penguapan pelarut aseton/aquades 50/50



Ekstrak kental kulit kakao

Perlakuan Hewan Uji Sewaktu Penelitian



Adaptasi hewan coba



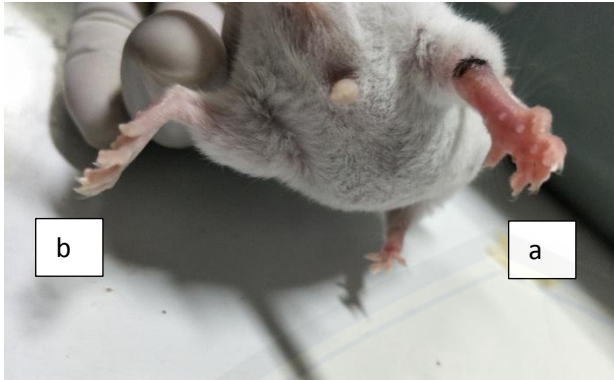
Penyondean pada hewan coba



Injeksi karagenin 1% secara subplantar



Pengukuran volume edema pada telapak kaki hewan coba



Perbandingan kaki yang telah diinjeksi karagenin (a) dengan kaki yang tidak diinjeksi karagenin (b)

