



**POTENSI EKSTRAK ETANOL KAKAO (*Theobroma cacao* L.)
DALAM MENGHAMBAT KERUSAKAN ERITROSIT YANG
DIINDUKSI RACUN *Physalia utriculus* SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

Oleh

**Adinningtyas Intansari
NIM 152010101103**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2019**



**POTENSI EKSTRAK ETANOL KAKAO (*Theobroma cacao* L.)
DALAM MENGHAMBAT KERUSAKAN ERITROSIT YANG
DIINDUKSI RACUN *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

Adinningtyas Intansari
NIM 152010101103

FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2019

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT atas segala nikmat, karunia, dan hidayah-Nya sehingga saya masih diberikan kesempatan untuk bersyukur dan menuntut ilmu, beserta Nabi Muhammad SAW yang selalu menjadi tauladan bagi saya;
2. Orang tua saya tercinta, Ibunda Wiji Sutiyah dan Ayahanda Kasyanto yang selalu memberikan dukungan, bimbingan, dan do'a yang tiada henti sepanjang waktu;
3. Guru-guru tercinta sejak taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi yang telah memberikan ilmu dan mendidik saya dengan penuh kesabaran serta mencurahkan segala kemampuannya untuk membimbing saya;
4. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

MOTTO

Sebesar kemauanmu sebesar itu pula yang kau dapatkan.*)



*) Zainuddin, A. 2010. Man Jadda Wajada. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Adinningtyas Intansari

NIM : 152010101103

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Potensi Ekstrak Etanol Kakao (*Theobroma Cacao* L.) dalam Menghambat Kerusakan Eritrosit yang Diinduksi Racun *Physalia utriculus* Secara *In Vitro*” 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 dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, Januari 2019

Yang menyatakan,

Adinningtyas Intansari

NIM 152010101103

SKRIPSI

**POTENSI EKSTRAK ETANOL KAKAO (*Theobroma cacao* L.)
DALAM MENGHAMBAT KERUSAKAN ERITROSIT YANG
DIINDUKSI RACUN *Physalia utriculus* SECARA *IN VITRO***

Oleh

**Adinningtyas Intansari
NIM 152010101103**

Pembimbing

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

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Laksmi Indreswari, Sp. B.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Potensi Ekstrak Etanol Kakao (*Theobroma Cacao* L.) dalam Menghambat Kerusakan Eritrosit yang Diinduksi Racun *Physalia utriculus* Secara *In Vitro*” karya Adinningtyas Intansari telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Tim Penguji:

Ketua,

Anggota I,

dr. Dina Helianti, M. Kes
NIP. 197411042000122001

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

Anggota II,

Anggota III,

dr. Al Munawir, M. Kes, Ph. D.
NIP. 196909011999031003

dr. Laksmi Indreswari, Sp. B.
NIP. 198309012008012012

Mengesahkan
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember,

dr. Supangat, M.Kes, Ph.D, Sp.BA
NIP 197304241999031002

RINGKASAN

Potensi Ekstrak Etanol Kakao (*Theobroma cacao* L.) dalam Menghambat Kerusakan Eritrosit yang Diinduksi Racun *Physalia utriculus* Secara *In Vitro*; Adinningtyas Intansari, 152010101103; 2019; 77 lembar; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

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 berbentuk *gelatinous bodies*. 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. Respons sistemik melalui peredaran darah menyebabkan hemolisis dan kerusakan pada pembuluh darah. 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.

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 memberikan perlindungan dan memperkuat resistensi terhadap hemolisis.

Metode hemolisis merupakan salah satu uji aktivitas racun yang sederhana dan dapat dilihat secara langsung. 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.

Penelitian ini menggunakan desain penelitian *true experimental* secara *in vitro* dengan rancangan *post test only control group design*, yaitu penilaian hanya dilakukan setelah mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak kakao. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini 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*. Sampel 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.

Hasil penelitian didapatkan rata-rata kecepatan lisis eritrosit pada kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol kakao 0,2%, 0,1%, 0,04%, dan 0,02% berturut-turut (detik \pm standar deviasi) ialah $858,25 \pm 94,44$; $1.000,5 \pm 159,93$; $678,5 \pm 19,71$; dan $1.006 \pm 159,50$. Rata-rata kecepatan lisis eritrosit pada kelompok kontrol negatif sebesar $1.025 \pm 164,63$, kelompok kontrol positif dengan pemberian *N-Acetylcystein*, dan kelompok kontrol normal dapat bertahan

hingga satu jam setelah pemberian racun. Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak etanol kakao dengan kadar 0,2%, 0,1%, 0,04%, dan 0,02% tidak berpotensi menghambat kerusakan eritrosit yang telah diinduksi racun *Physalia utriculus* secara *in vitro*.



PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah Swt. atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Potensi Ekstrak Etanol Kakao (*Theobroma Cacao* L.) dalam Menghambat Kerusakan Eritrosit yang Diinduksi Racun *Physalia utriculus* Secara *In Vitro*”. Skripsi disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) di 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. Laksmi Indreswari, Sp. B selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga, dan perhatian dalam penulisan skripsi ini;
3. dr. Pulong Wijang Pralampita, Ph. D dan dr. Dina Helianti, M. Kes selaku Dosen Penguji I, serta dr. Desie Dwi Wisudanti, M. Biomed selaku Dosen Penguji II atas segala saran dan masukan yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
4. seluruh staf pengajar dan karyawan Fakultas Kedokteran Universitas Jember atas bimbingan dan bantuannya selama menjadi mahasiswa;
5. nenek tercinta, Ibu Sutinah yang selalu memberikan dukungan dan do'a sepanjang waktu;
6. orangtua tercinta, Ibunda Wiji Sutyah dan Ayahanda Kasyanto yang selalu memberikan dukungan, bimbingan, do'a, dan pengorbanan yang tiada henti;
7. kakak Nur Ika Sofiyanti, Nugrahaeni Firdausi, dan Widya Syanti Hakimi tersayang yang selalu memberikan bimbingan, semangat dan kasih sayang selama ini;

8. rekan kerja seperjuangan dalam penelitian Sarwendah Siswi Winasis dan Graitia Yuli Ambarwati atas kerja sama dan bantuan yang diberikan selama penelitian;
9. sahabat-sahabat tercinta Fatihah Mardiana Kartika Dewi, Azizah Mursyidati Nurulhayati, Indah Permata Sholicha, Ika Aulia Kurniasari, Laila Rizqi Kurniawati, Astri Mutia Saraswati, dan keluarga besar Coccoyx 2015 lain yang selalu memberikan semangat, dukungan, dan bantuan selama menempuh pendidikan di Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
10. sahabat-sahabat KKN PPM 2018 atas semangat dan dukungan yang diberikan;
11. semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu, terimakasih 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, Januari 2019

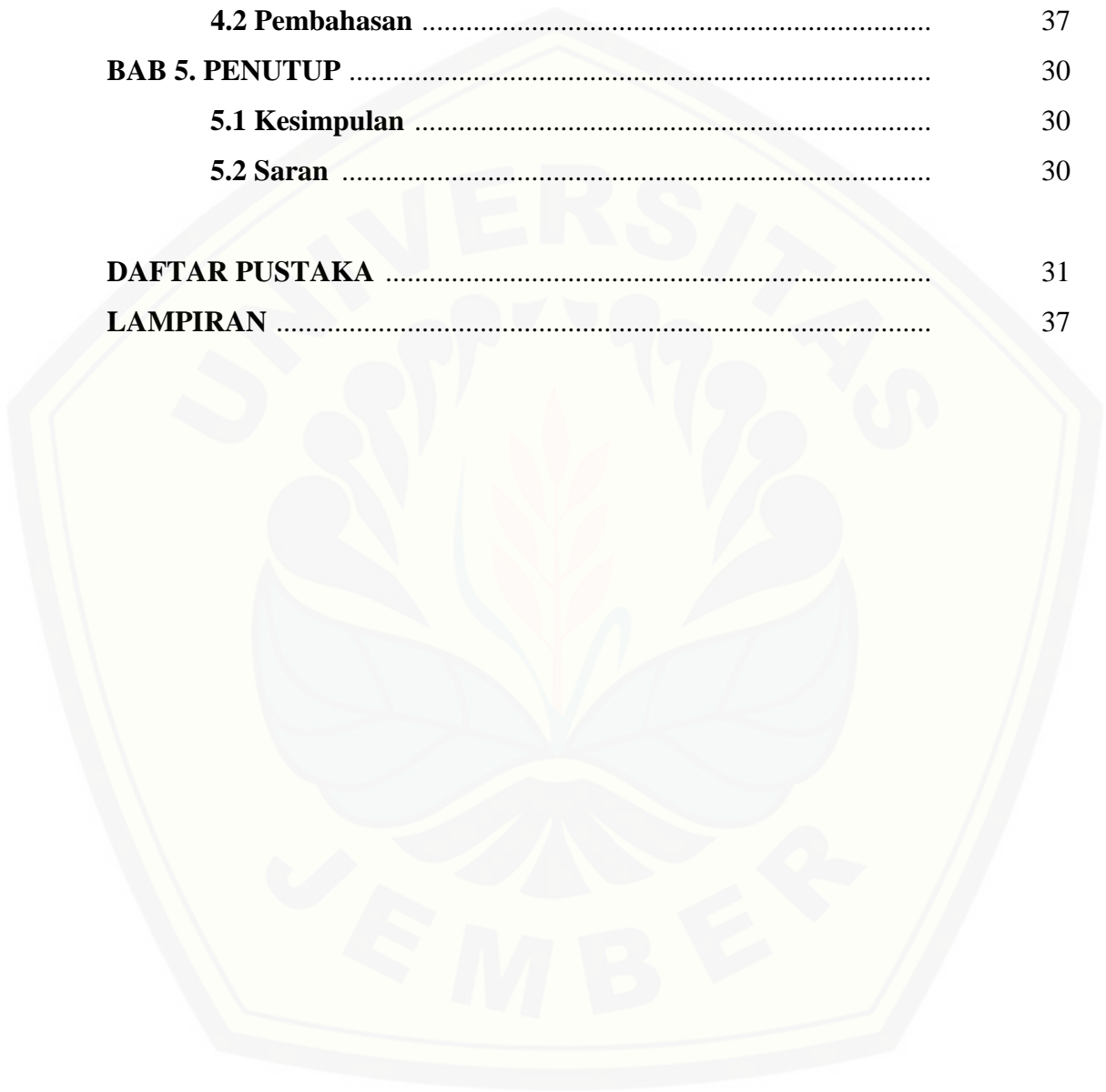
Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBING	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Ubur-ubur	4
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi	4
2.1.2 Siklus Hidup	6
2.1.3 Patofisiologi Sengatan Ubur-Ubur	7
2.2 <i>Physalia utriculus</i>	7
2.2.1 Morfologi dan Taksonomi	7
2.2.2 Kandungan dan Efek Sengatan Ubur-Ubur	9
2.3 Isolasi racun <i>Physalia utriculus</i>	10

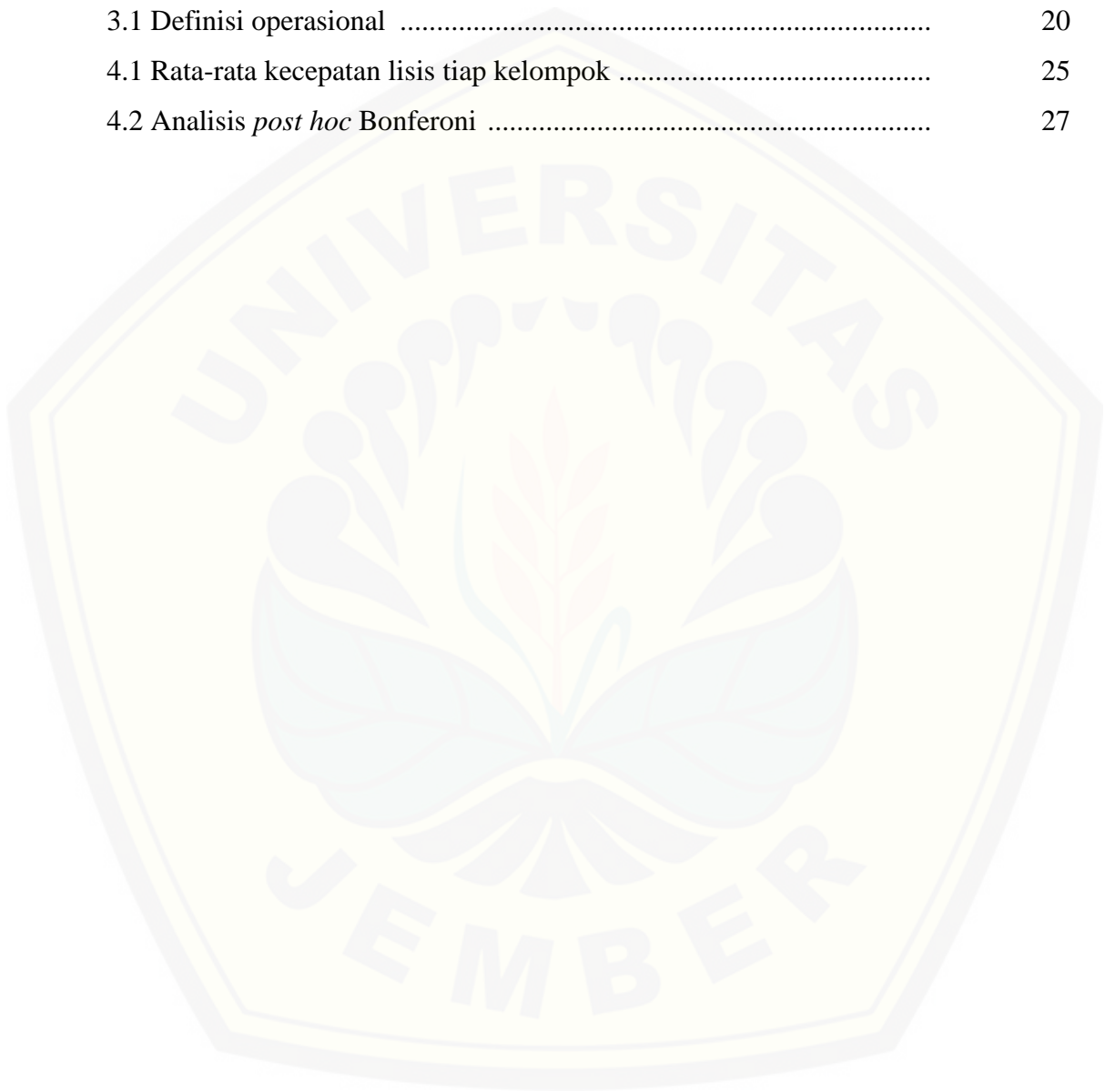
2.4 Sel Darah Merah (Eritrosit)	11
2.5 Teknik Pemeriksaan Hemolisis Eritosit	12
2.6 Kakao	12
2.6.1 Morfologi dan Taksonomi	12
2.6.2 Kandungan Kakao	14
2.7 Ekstraksi	15
2.8 Kerangka Konseptual	16
2.9 Hipotesis Penelitian	17
BAB 3. METODE PENELITIAN	18
3.1 Jenis Penelitian	18
3.2 Rancangan Penelitian	18
3.3 Populasi dan Sampel Penelitian	18
3.3.1 Populasi Penelitian	18
3.3.2 Sampel Penelitian	19
3.4 Tempat dan Waktu Penelitian	19
3.5 Variabel Penelitian	20
3.5.1 Variabel Bebas	20
3.5.2 Variabel Terikat	20
3.5.3 Variabel Terkendali	20
3.6 Definisi Operasional	20
3.7 Alat dan Bahan Penelitian	21
3.7.1 Alat Penelitian	21
3.7.2 Bahan Penelitian	21
3.8 Prosedur Penelitian	21
3.8.1 Uji Kelayakan Etik	21
3.8.2 Persiapan Racun Ubur-ubur (<i>Physalia utriculus</i>)	22
3.8.3 Ekstraksi Etanol Kakao	22
3.8.4 Persiapan Pembuatan Eritrosit 1%	22
3.8.5 Pemeriksaan Hemolisis	23
3.9 Analisis Data	23
3.10 Alur Penelitian	24

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	25
4.1 Hasil Penelitian	25
4.1.1 Hasil Pengamatan Kecepatan Lisis.....	25
4.1.2 Analisis Statistik	26
4.2 Pembahasan	37
BAB 5. PENUTUP	30
5.1 Kesimpulan	30
5.2 Saran	30
DAFTAR PUSTAKA	31
LAMPIRAN	37



DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Perbandingan kandungan biji dan kulit kakao	15
3.1 Definisi operasional	20
4.1 Rata-rata kecepatan lisis tiap kelompok	25
4.2 Analisis <i>post hoc</i> Bonferoni	27



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Struktur tubuh ubur-ubur simetris radial.....	5
2.2 Bentuk dasar morfologi ubur-ubur.....	5
2.3 Siklus hidup ubur-ubur.....	6
2.4 Mekanisme sengatan ubur-ubur.....	7
2.5 <i>Physalia utriculus</i>	8
2.6 Skema biosintetis polifenol pada tanaman kakao.....	14
2.7 Kerangka konseptual.....	16
3.1 Skema rancangan penelitian.....	18
3.2 Alur penelitian.....	24
4.1 Grafik rata-rata kecepatan lisis.....	25

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
3.1 Pemeriksaan Hemolisis	37
3.2 Etik Penelitian	39
3.3 Lembar Persetujuan (<i>Informed consent</i>)	41
3.4 Surat Rekomendasi Bebas Plagiasi	43
4.1 Data Kecepatan Lisis	44
4.2 Gambaran Perubahan Morfologi Eritrosit	46
4.3 Hasil Analisis Statistik	53
4.4 Dokumentasi Kegiatan Penelitian	55

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

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 berbentuk *gelatinous bodies*. Persebaran populasi ubur-ubur dipengaruhi oleh beberapa hal, salah satunya ialah perubahan iklim yang diprediksi sebagai penyebab dari meningkatnya jumlah populasi ubur-ubur (Uye, 2008; Purcell, 2005; Mills, 2001; Brodeur *et al.*, 1999).

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 *et al.*, 2011).

Terdapat tiga kematian akibat spesies *Physalia sp.* di Amerika Serikat pada tahun 1989 (Daubert, 2008; Burnett dan Gable, 1989; Stein *et al.*, 1989). Selain itu, terdapat sekitar 500 kasus sengatan ubur-ubur di Australia Barat dan Selatan (Goggi *et al.*, 2004), serta lebih dari 100 orang disengat ubur-ubur pada tahun 2009 di Pantai Yorktown, Virginia (Cawley, 2009). 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 terdiri dari campuran komponen antigenik polipeptida dan enzim yang bersifat patogenik pada manusia yang dapat menyebabkan *local cutaneous reaction* dan respons sistemik yang fatal. (Alvian *et al.*, 1995). Respons sistemik melalui peredaran darah menyebabkan hemolisis dan kerusakan pada pembuluh darah. Kerusakan ini dapat menyebabkan

blocking ventrikel dan katup jantung. Akibatnya terjadi akumulasi cairan pada rongga paru-paru yang menyebabkan dispnea dan edema (Alam *et al.*, 2006).

Metode hemolisis eritrosit merupakan salah satu uji aktivitas racun sederhana yang dapat dilihat secara langsung. 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 tentang inhibisi terjadinya hemolisis terus dilakukan, seperti pemberian zink glukonat yang telah terbukti menghambat hemolisis pada model penelitian *in vitro* (Yanagihara, 2013).

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*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, rumusan masalah penelitian ini adalah apakah ekstrak etanol kakao (*Theobroma cacao* L.) berpotensi dalam menghambat kerusakan eritrosit yang diinduksi racun *Physalia utriculus*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi ekstrak etanol kakao (*Theobroma cacao* L.) dalam menghambat kerusakan eritrosit yang diinduksi racun *Physalia utriculus* secara *in vitro*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Ilmiah

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai potensi ekstrak etanol kakao (*Theobroma cacao* L.) dalam menghambat kerusakan eritrosit yang diinduksi racun *Physalia utriculus*.

1.4.2 Manfaat Aplikatif

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan sumbangan ilmu pengetahuan dan teknologi kedokteran mengenai ekstrak etanol kakao (*Theobroma cacao* L.) yang dapat digunakan sebagai salah satu bahan untuk menghambat kerusakan eritrosit akibat racun *Physalia utriculus* di masa mendatang.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

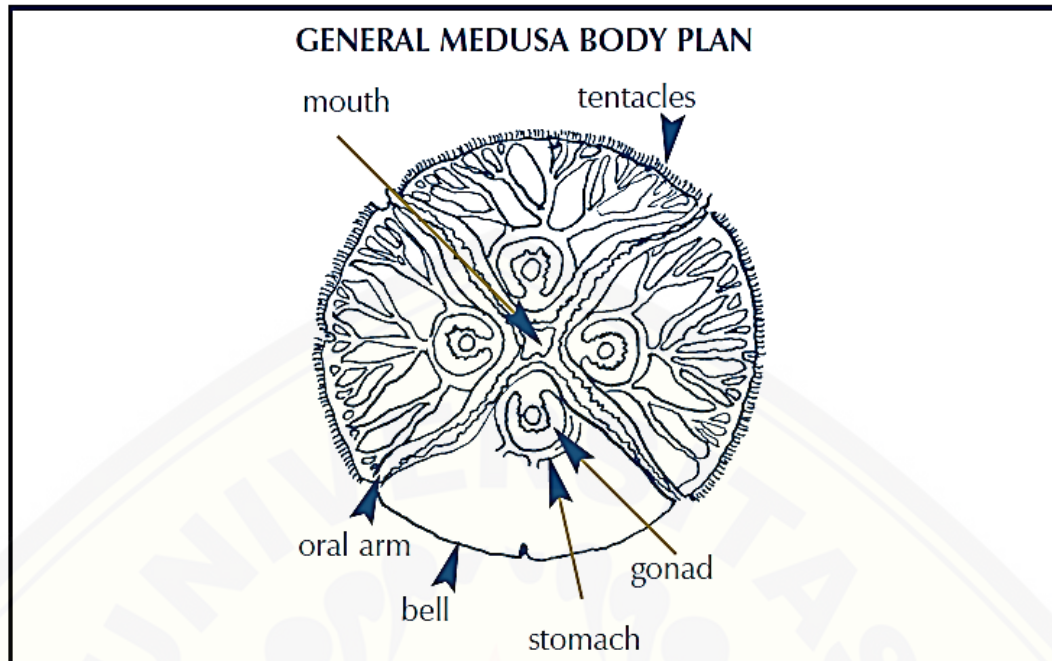
2.1 Ubur-ubur

Ubur-ubur merupakan salah satu biota laut invertebrata berbentuk *gelatinous bodies* yang dapat menyebabkan terjadinya keracunan pada manusia. Peningkatan populasi ubur-ubur diprediksi akibat dari perubahan iklim. Selain itu, kehadiran ubur-ubur juga bergantung pada jumlah makanan dan peningkatan dari pajanan sinar matahari (Uye, 2008; Purcell, 2005; Mills, 2001; Graham *et al.*, 2001; Brodeur *et al.*, 1999). Habitat ubur-ubur berupa air laut beriodin yang diperlukan polip untuk berubah menjadi medusa (Whitaker *et al.*, 2005).

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

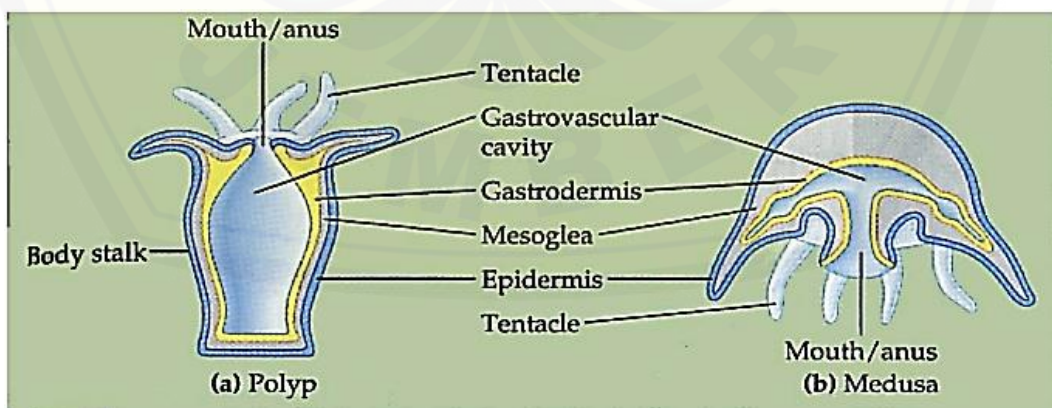
Ubur-ubur termasuk ke dalam Filum Cnidaria (dahulu disebut dengan Coelenterata) yang terbagi menjadi lima kelas, yaitu *Staurozoa* (*stalked jellyfish* atau ubur-ubur bertangkai), *Scyphozoa* (*true jellyfish* atau ubur-ubur sejati), *Hydrozoa* (disebut juga *Portuguese man-of-war* yang terdiri atas spesies *Physalia* dan *Hydroid coral*), *Cubozoa* (terdiri atas *Box jellyfish* dan *Chiropsalmus quadrigatus*), dan *Anthozoa* (terdiri atas anemon laut dan terumbu karang) (Tibbals, 2006).

Ubur-ubur memiliki bermacam-macam ukuran, warna, dan jumlah tentakel bergantung pada spesiesnya. Struktur tubuh ubur-ubur pada Gambar 2.1 berbentuk simetris radial dengan sistem saraf sangat primitif yang hanya terdiri dari reseptor pendeteksi cahaya, bau, dan beberapa rangsangan lain. Kesimetrisan tubuh ubur-ubur ini berpengaruh terhadap kemampuannya dalam mendeteksi dan merespons adanya mangsa atau bahaya dari berbagai arah. Panjang tentakel ubur-ubur juga bervariasi mulai dari beberapa milimeter hingga 40 meter. Tentakel ubur-ubur memiliki *cnidocytes* yang terdiri dari 3 organel yang disebut *cnidae*. Salah satu organel *cnidae* ialah nematokis, yang merupakan kapsul berlubang berisi benang melingkar yang di dalamnya terdapat racun ubur-ubur (Indraeni, 2009; Whitaker *et al.*, 2005; Williamson *et al.*, 1996; Kramp, 1961).



Gambar 2.1 Struktur tubuh ubur-ubur simetris radial (Sumber: Whitaker *et al.*, 2005)

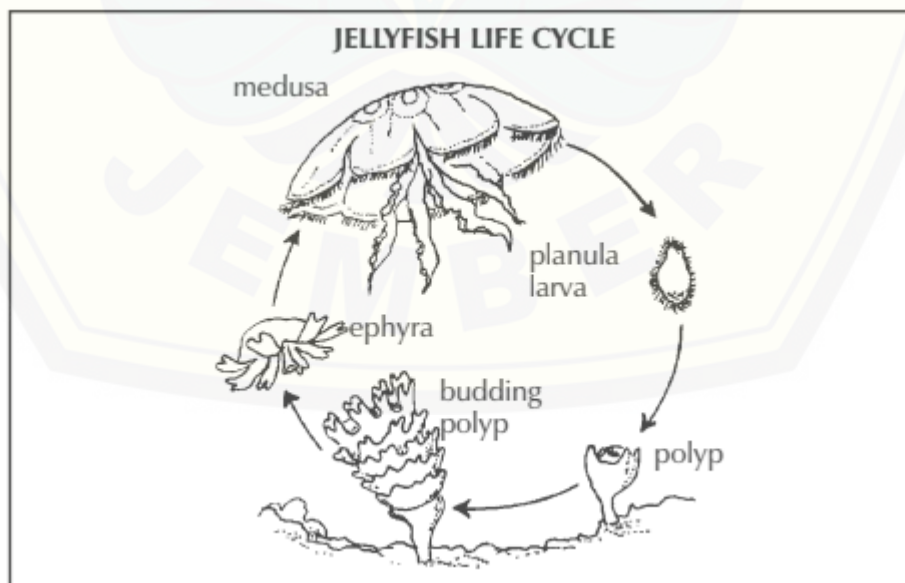
Dinding tubuh ubur-ubur terdiri atas tiga lapisan yang dapat dilihat pada Gambar 2.2. Lapisan luar (epidermis) yang melapisi permukaan ubur-ubur, lapisan dalam (gastroepidermis) yang melapisi usus, dan *middle jelly* (mesoglea) berupa lapisan tipis elastik yang terletak diantara epidermis dan gastrodermis. Ubur-ubur memiliki rongga gastrovaskular sederhana yang disebut *coelenteron*, berfungsi sebagai sistem sirkulasi dan pencernaan (Whitaker *et al.*, 2005).



Gambar 2.2 Bentuk dasar morfologi ubur-ubur (Sumber: *Biology 3B Laboratory Invertebrata*, 2010)

2.1.2 Siklus Hidup

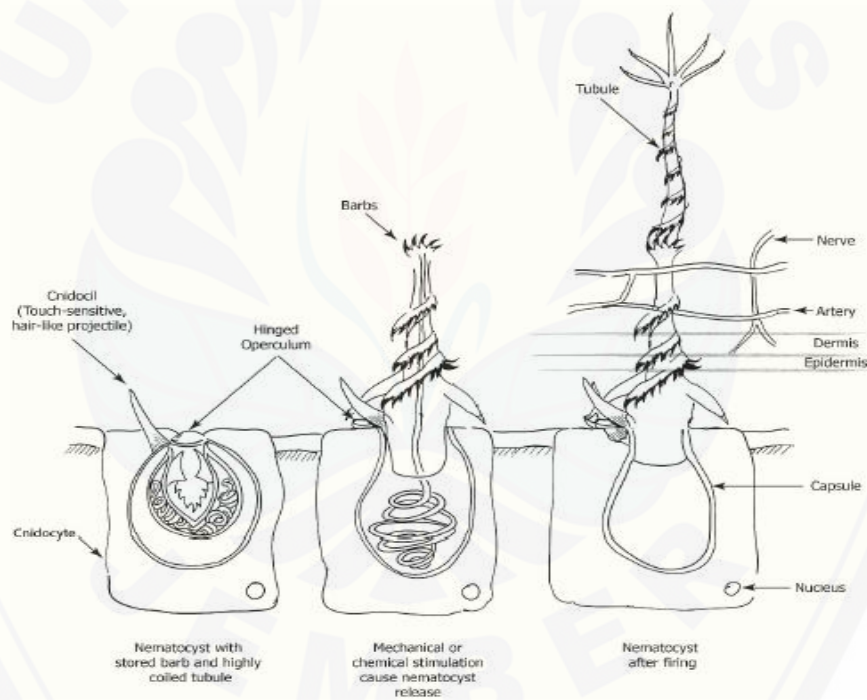
Siklus hidup ubur-ubur terbagi menjadi dua bagian yang dapat dilihat pada Gambar 2.3, yaitu bentuk aseksual berupa polip dan bentuk seksual berupa medusa. Organ reproduksi terletak di dalam gastrodermis. Dalam proses reproduksinya, ubur-ubur jantan mengeluarkan sperma melalui mulut lalu dikeluarkan ke air, sperma masuk ke dalam mulut betina dan terjadi fertilisasi. Pembelahan menghasilkan *blastula* berlekuk, kemudian menjadi larva *planula*. *Planula* keluar dari tubuh betina ke air untuk menempelkan tubuhnya pada karang di dasar laut dan tumbuh menjadi larva polip yang disebut *scyphistoma*. *Scyphistoma* menggunakan tentakelnya untuk mencari makan berupa organisme mikroskopis. *Scyphistoma* dapat memperbanyak diri dengan reproduksi aseksual. Medusa terbentuk dari pembelahan transversal ujung oral *scyphistoma*, yang disebut stobilisasi, kemudian terbentuk setumpuk medusa muda yang disebut epifera. Kemudian medusa muda melepaskan diri dan berenang bebas. Dalam beberapa minggu, epifera akan tumbuh menjadi ubur-ubur dewasa yang disebut medusa dan menyelesaikan siklus hidupnya. Setelah strobilisasi selesai, *scyphistoma* akan tumbuh menjadi polip lagi untuk kemudian membentuk epifera pada tahun berikutnya seperti pada Gambar 2.3 (Whitaker *et al.*, 2005).



Gambar 2.3 Siklus hidup ubur-ubur (Sumber: Whitaker *et al.*, 2005)

2.1.3 Patofisiologi Sengatan Ubur-Ubur

Ubur-ubur mempunyai sel epitel penyengat yang disebut *cnidocytes* yang di dalamnya terdapat *cnidocyst* berisi nematokis atau sel racun. Stimulasi mekanik dan kimia menyebabkan rangsangan pada tubulus dalam *cnidocytes*. Tubulus nematokis dibebaskan dari kapsul setelah sepersekian detik (700 ns). Saat terjadi kontak dengan objek, tubulus atau gulungan benang ditembakkan dan racun akan diinjeksikan pada bagian epidermis dan dermis atas korban. Racun ubur-ubur yang berhasil masuk mikrovaskulardermis akan berada dalam sirkulasi sistemik dan menyebar ke seluruh tubuh korban secara hematogen seperti dijelaskan pada Gambar 2.4. Setelah menyengat korban, nematokis akan beregenerasi melalui diferensiasi sel pluripoten (Cheng *et al.*, 2007).



Gambar 2.4 Mekanisme sengatan ubur-ubur (Sumber: Montgomery *et al.*, 2016)

2.2 *Physalia utriculus*

2.2.1 Morfologi dan Taksonomi

Physalia utriculus yang dikenal sebagai *Indo-Pacific Portuguese man-o'-war* atau *blue bottle* berbeda dengan *Physalia physalis* yang hanya memiliki satu tentakel dengan mayoritas panjangnya dapat mencapai 10 meter dan lebar 5-6

sentimeter dengan ratusan ribu nematokis di sepanjang tentakelnya. Nematokis inilah yang mengandung racun (Goldsmith *et al.*, 2012; Tibballs, 2006; Yanagihara *et al.*, 2002). Menurut King *et al.* (2003) taksonominya ialah sebagai berikut:

Physalia utriculus

Kingdom : *Animalia*

Filum : *Cnidaria*

Kelas : *Hydrozoa*

Famili : *Physaliidae*

Genus : *Physalia*

Spesies : *Physalia utriculus*



Gambar 2.5 *Physalia utriculus* (Sumber: Gershwin *et al.*, 2010)

Physalia utriculus seringkali ditemukan dalam bentuk *pneumatophore* berwarna biru yang mengapung di atas permukaan air laut. *Pneumatophore* terdiri dari *dactylozoid*, *gonozoid*, dan *gastrozoid* (Yanagihara *et al.*, 2002). *Pneumatophore* berbentuk horizontal asimetris dan panjangnya mencapai 10-15 cm (Goggin *et al.*, 2004; Bouillon *et al.*, 2004). *Pneumatophore* memungkinkan ubur-ubur untuk bersandar secara horizontal saat angin berhembus dan terbawa oleh arus air (Cegolon *et al.*, 2013). *Dactylozoid* merupakan tentakel yang berbentuk untaian panjang yang digunakan sebagai pertahanan diri dan menangkap mangsa. *Gonozoid* merupakan tentakel yang digunakan untuk bereproduksi, sedangkan *gastrozoid* merupakan tentakel yang digunakan untuk

mencerna makanan (King *et al.*, 2003). *Physalia utriculus* dapat ditemukan di daerah Indo-Pasifik, Laut India, dan Atlantis selatan. *Physalia utriculus* lebih sering ditemukan di perairan yang panas dan beriklim sedang. Tetapi terkadang dapat pula ditemukan di perairan Atlantik yang dingin, seperti di Perancis Utara, Belgia, dan Inggris (Cegolon *et al.*, 2013).

Persebaran *Physalia utriculus* di Indonesia belum banyak diteliti, akan tetapi beberapa kasus telah dilaporkan pada tahun 2005-2009 terdapat sengatan ubur-ubur di delapan tempat, yaitu Pantai Sanur di Bali, Pantai Depok di Bantul, Pantai Teleng Ria, Pantai Parangtritis di Bantul, Pantai Samas di Bantul, Pantai Widarapayung di Cilacap, Pantai Banyuputih di Situbondo, dan Pantai Mlandingan di Situbondo (Mujiono, 2010).

2.2.2 Kandungan dan Efek Sengatan Ubur-ubur

Racun *Physalia* dapat menimbulkan efek neurotoksik, kardiotoxik, dan hemolitik (Suput, 2009 dan Tamkun; Heissinger, 1981). Racun ini menyebabkan transport ion Ca^{2+} menjadi abnormal, mengacaukan membran sel, melepaskan mediator inflamasi, menyebabkan toksik pada miokardium, jaringan saraf, hepar, dan ginjal (Cheng *et al.*, 2007). Sengatan ubur-ubur menyebabkan urtikaria, edema, kelemahan otot, parastesia, dispnea, shok, gangguan jantung, dan paru-paru serta kematian (Hoover, 2004; Chung *et al.*, 2001).

Komponen peptida litik racun *Physalia utriculus* menyebabkan peningkatan permeabilitas sel yang berpengaruh terhadap transpor ion, pembengkakan sel, dan terjadinya lisis secara osmotik (Mariottini, 2014). Pengaruh permeabilitas sel mengakibatkan pelepasan kalium dilanjutkan dengan pecahnya eritrosit setelah masuknya racun ke dalam pembuluh darah (Yanagihara dan Shohet, 2012). Pelepasan kalium menghasilkan lesi seperti pori di membran sel target akibat pengikatan komponen racun pada membran sel diikuti adanya oligomerisasi racun yang memicu osmosis koloid dan menyebabkan lisis (Edwards *et al.*, 2002).

Hemolisin merupakan komponen lain pada racun *Physalia utriculus* yang dapat menyebabkan pecahnya membran eritrosit. Pada penelitian *in vivo*

perubahan eritrosit meliputi *blebbing membrane* akibat penurunan tekanan permukaan pada membran sel, penambahan larutan ke dalam sel eritrosit dan zat/unsur kimia tertentu, pemanasan dan pendinginan, serta *acantocytosis* yang terjadi karena perubahan pada distribusi atau proporsi dari membran lipid, membran protein atau abnormalitas pada bagian membran yang lain. Pada penelitian *in vitro* juga didapatkan adanya perubahan sel eritrosit berupa *blebbing membrane*, edema, dan lisis akibat penambahan racun *Physalia utriculus* yang mengganggu transportasi ion melalui plasma membran. Hal ini disebabkan karena terjadinya peningkatan ion K^+ yang keluar dari membran sel dan peningkatan berlebih ion Na^+ ke dalam sel menyebabkan permeabilitas sel menjadi terganggu. Hal ini mengakibatkan terganggunya pompa Na-K ATPase dan ion Ca^{2+} tetap berada di dalam sel. Keberadaan ion Ca^{2+} akan membantu lepasnya enzim laktat dehidrogenase ke dalam sel sehingga menyebabkan kerusakan sel dan berkurangnya integritas dari membran plasma menyebabkan eritrosit menjadi tidak permeabel dan mudah mengalami lisis (Larasati *et al.*, 2015; Edwards dan Heissinger, 2000).

2.3 Isolasi Racun *Physalia utriculus*

Metode isolasi racun *Physalia utriculus* dimulai dengan pemisahan tentakel dan medusa dari *Physalia utriculus* dengan menggunakan alat bedah. Kemudian tentakel dilarutkan dalam air laut dengan perbandingan 1:5 dan disimpan dalam suhu $4^{\circ}C$ selama 24 jam agar terjadi autolisis. Setelah 24 jam, isi tabung disentrifugasi selama 30 menit dalam suhu $4^{\circ}C$ untuk memudahkan benang-benang racun dalam nematokis keluar. Setelah itu diambil beberapa tetes dari bagian supernatan untuk dilakukan pengujian mikroskopis untuk menilai keluarnya toksin dari nematokis. Tabung yang berisi tentakel disimpan kembali dalam lemari pendingin pada suhu $4^{\circ}C$ selama 24 jam. Kemudian setelah 24 jam, kembali dilakukan sentrifugasi selama 30 menit. Selanjutnya diambil beberapa tetes dari bagian supernatan untuk dilakukan pengujian mikroskopis untuk menilai keluarnya toksin dari nematokis. Prosedur ini dilakukan berulang-ulang hingga hasil dari pemeriksaan mikroskopis menunjukkan sebagian besar dari racun telah

keluar dari nematokis. Kemudian ekstrak tentakel yang telah dilarutkan dengan air laut tersebut disaring menggunakan kertas saring sebanyak 4 lapis. Setelah disaring, hasil dari saringan akan di lipolizer untuk memisahkan racun dengan air menggunakan *dry freeze vacuum* (Larasati *et al.*, 2015).

2.4 Sel Darah Merah (Eritrosit)

Eritrosit atau sel darah merah merupakan suatu cakram bikonkaf dengan diameter sekitar 7 mikron yang berfungsi sebagai media pertukaran gas oksigen dari paru menuju jaringan tubuh dan membawa karbon dioksida dari jaringan tubuh ke paru-paru. Bentuk bikonkaf menyebabkan eritrosit bersifat fleksibel sehingga dapat melewati lumen pembuluh darah yang kecil dengan lebih baik. Eritrosit terdiri atas tiga komponen, yaitu membran eritrosit, sistem enzim (dalam *Embden Meyerhoff pathway: pyruvate kinase* dan dalam *pentose pathway: enzim G6PD*), dan hemoglobin yang berfungsi sebagai pengangkut oksigen (Bakta, 2006).

Hemolisis adalah pemecahan eritrosit dalam pembuluh darah sebelum waktunya (sebelum masa hidup rata-rata 120 hari). Bila terjadi hemolisis maka akan terjadi peningkatan prekursor eritrosit dan pelepasan retikulosit prematur atau hiperplasi eritroid pada sumsum tulang. Lisis terjadi akibat kerusakan membran, presipitasi hemoglobin dalam sitoplasma, dan menurunnya fleksibilitas eritrosit. Kapiler lien dengan diameter yang relatif kecil dan suasana relatif hipoksik akan menyebabkan destruksi eritrosit melalui mekanisme fragmentasi. Pemecahan eritrosit menghasilkan globin yang akan dikembalikan ke *protein pool*, serta besi yang dikembalikan ke makrofag yang selanjutnya akan dipakai kembali, sedangkan protoporfirin akan menghasilkan gas CO dan bilirubin. Bilirubin dalam darah akan berikatan dengan albumin menjadi bilirubin indirek, lalu mengalami konjugasi dalam hati menjadi bilirubin direk kemudian dibuang melalui empedu sehingga meningkatkan sterkobilinogen dalam feses dan uribilinogen dalam urine (Bakta, 2006).

2.5 Teknik Pemeriksaan Hemolisis Eritrosit

Eritrosit dapat mengkerut pada larutan dengan tekanan osmotik yang lebih tinggi dari tekanan osmotik plasma. Sedangkan eritrosit akan membengkak pada larutan dengan tekanan osmotik lebih rendah, menjadi cembung, dan menghilangnya hemoglobin yang akan larut dalam plasma darah lalu memberi warna merah pada plasma. Hemolisis dapat disebabkan oleh beberapa hal, yakni racun, bisa ular, parasit darah, atau larutan hipotonik. Terjadinya hemolisis disebabkan oleh pecahnya eritrosit akibat menurunnya tekanan osmotik plasma darah. Hal ini menyebabkan air masuk ke dalam sel secara osmosis melalui dinding semipermeabel sehingga sel darah akan membengkak lalu mengakibatkan peregangan pada dinding sel dan akhirnya lisis atau pecahnya sel darah merah (Price dan Wilson, 2005).

Eritrosit merupakan sebuah model uji coba *in vitro* sederhana untuk mengevaluasi sitotoksitas sebuah substansi yang beracun. Racun yang bersifat sitolitik bekerja melalui salah satu dari dua mekanisme. Mekanisme pertama ialah mekanisme enzimatik dengan adanya ikatan komponen sitolitik dengan membran glikolipid atau glikoprotein (Burnett dan Calton, 1987) dan mekanisme kedua ialah mekanisme stoikiometri dengan adanya penyisipan molekul racun ke dalam membran plasma diikuti adanya oligomerisasi untuk membentuk pori-pori transmembran dan menyebabkan lisis (Bhakdi dan Tranum-Jensen, 1988).

Pemeriksaan hemolisis eritrosit dilakukan dengan pengambilan sampel eritrosit manusia yang didapatkan dari *whole blood* donor dan dibagi menjadi beberapa kelompok sebelum diinduksi dengan racun *Physalia utriculus*. Lalu dilakukan pengamatan morfologi eritrosit menggunakan *inverted Olympus microscope* dengan pembesaran 400x (Larasati *et al*, 2015).

2.6 Kakao

4.1.1 Morfologi dan Taksonomi

Kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan tumbuhan berbentuk pohon yang hidup di daerah sub tropis dan berasal dari Amerika Selatan. Di habitat aslinya kakao dapat tumbuh dengan tinggi mencapai 10 meter, namun dengan

pembudidayaan, tinggi tanaman ini tidak lebih dari 5 meter untuk memperbanyak cabang produktifnya.

Kakao termasuk dalam kelompok tanaman *caulifloris*, yaitu tanaman yang berbuah dan berbunga pada batang dan cabang. Kakao dibagi menjadi dua bagian utama, yaitu bagian vegetatif meliputi akar, batang, dan daun. Bagian kedua ialah bagian generatif meliputi bunga dan buah (Siregar *et al.*, 1989). Kakao merupakan satu-satunya tanaman diantara 22 jenis tanaman marga *Theobroma* yang digunakan sebagai usaha komersial. Menurut Tjitrosoepomo (1988) taksonominya ialah sebagai berikut:

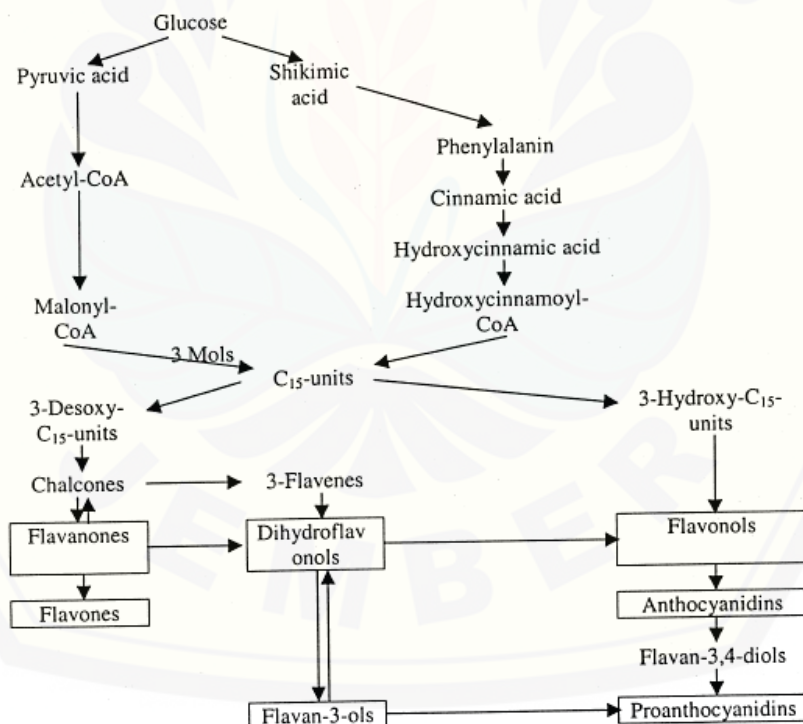
Kingdom : *Plantae*
Divisi : *Spermatophyta*
Sub-divisi : *Angiospermae*
Kelas : *Dicotyledoneae*
Sub-kelas : *Dialypetalae*
Ordo : *Malvales*
Famili : *Sterculiaceae*
Genus : *Theobroma*
Spesies : *Theobroma cacao*

Kakao merupakan tanaman yang bersifat dimorfisme atau memiliki dua bentuk tunas vegetatif. Tunas dengan arah tumbuh ke atas disebut tunas ortotrop atau tunas air, sedangkan tunas dengan arah pertumbuhan ke samping disebut tunas plagiotrop (cabang kipas atau *fan*) (Pusat Penelitian Kopi dan Kakao, 2010). Daun kakao memiliki ciri khusus, yaitu terdapat dua persendian yang terletak di pangkal dan ujung tangkai daun yang berfungsi sebagai pergerakan untuk menyesuaikan arah datangnya sinar matahari. Bentuk daunnya bulat memanjang (*oblongus*) dengan ujung daun meruncing (*acuminatus*) dan pangkal daun juga meruncing (*acutus*), susunan tulang daunnya menyirip dan tulangnya menonjol ke permukaan bawah helai daun. Biji kakao berwarna putih terbungkus daging buah (*pulpa*) yang tersusun dalam lima baris mengelilingi poros buah dengan jumlah beragam, yaitu 20-50 butir per buah. Bila dipotong melintang akan tampak biji tersusun oleh dua kotiledon berwarna putih untuk tipe criollo dan ungu untuk tipe

forastero yang saling melipat dan bagian pangkalnya menempel pada *embryo axis* (Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia, 2004).

4.1.2 Kandungan Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Biji kakao yang belum diolah memiliki kandungan senyawa polifenol sekitar 12-18% (Ackar *et al.*, 2013; Afoakwa *et al.*, 2012; Meng *et al.*, 2009; dan Cooper *et al.*, 2007) yang terdiri dari gugus polifenol flavan-3-ol/flavanol, *anthocyanidin* dan *proanthocyanidin* (Chin *et al.*, 2013; Hii *et al.*, 2009; Andreas-Lacueva, *et al.*, 2008; Engler dan Engler, 2004). Senyawa polifenol merupakan peroduk hasil metabolit sekunder yang disintesis melalui dua jalur utama, yaitu jalur shikimat dan jalur piruvat yang merupakan hasil metabolisme dari glukosa (Wollgast dan Anklam, 2000). Adapun biosintesis lengkap senyawa polifenol kakao seperti pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6 Skema biosintesis polifenol pada tanaman kakao (Sumber: Wollgast dan Anklam, 2000)

Senyawa polifenol yang terdapat pada kakao segar sebanyak 15-20%, pada kakao yang telah difermentasi sebanyak 5% dan sumber lain menyatakan

kandungan polifenol pada biji kakao sebanyak 17,36% seperti pada Tabel 2.1 (Wollgast dan Anklam, 2000; Mulato *et al.*, 2006; Kumari *et al.*, 2011). Senyawa oligomer polifenol kakao berupa *epicatechin*, *catechins*, dan *procyanidins* berpengaruh untuk menghambat hemolisis pada tikus percobaan, sehingga senyawa polifenol tersebut dapat memberi proteksi dan memperkuat resistensi terhadap hemolisis (Weisburger, 2001).

Tabel 2.1 Perbandingan kandungan biji dan kulit kakao

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

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

2.7 Ekstraksi

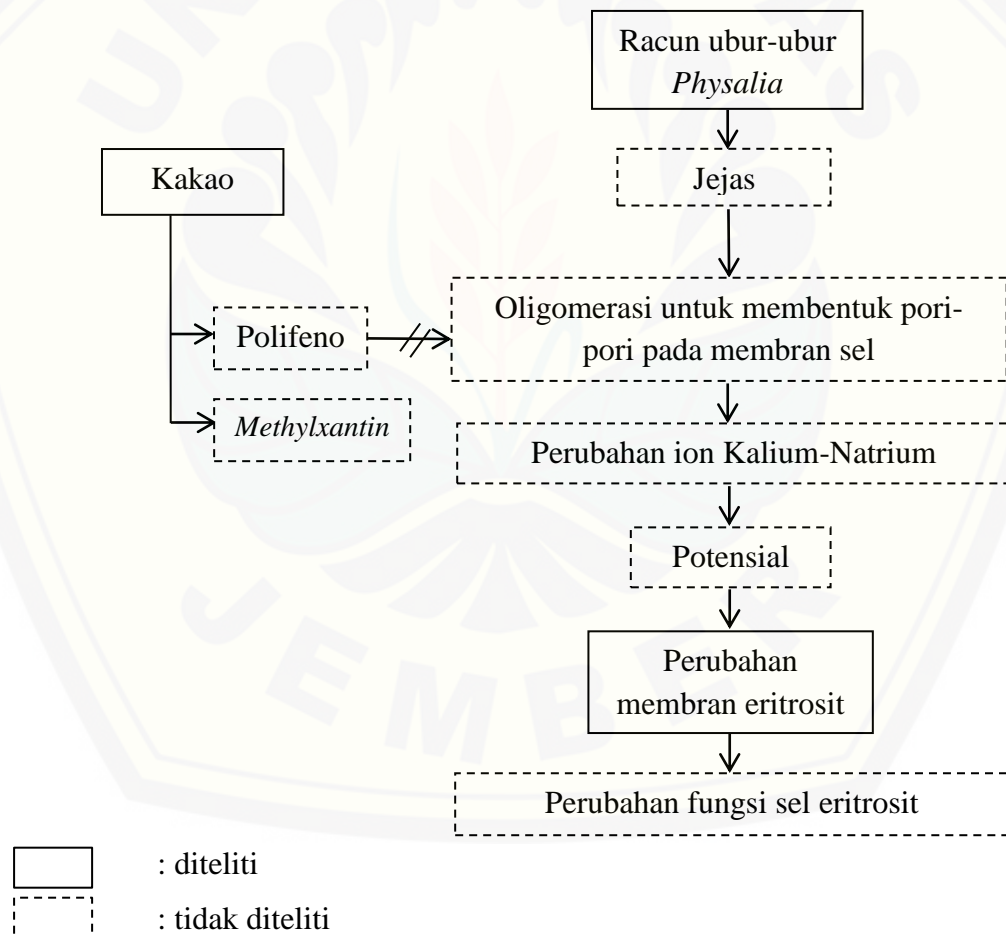
Metode ekstraksi ialah cara untuk memperoleh ekstrak dari senyawa aktif simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian rupa hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan yang berbentuk sediaan kental (Haryati, 2005).

Terdapat beberapa metode ekstraksi menggunakan pelarut, diantaranya ialah metode maserasi. Maserasi ialah proses penyaringan simplisia dengan cara

perendaman menggunakan pelarut yang sesuai dengan sesekali diaduk pada suhu kamar (Sinaga, 2009). Perendaman akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel. Zat aktif yang terkandung dalam rongga sel akan larut dan menyebabkan larutan dalam sel akan didesak keluar akibat adanya perbedaan konsentrasi hingga konsentrasinya seimbang antar larutan di dalam dan di luar sel. Cairan pelarut yang digunakan berupa air, etanol, dan pelarut lainnya (Ningsih *et al.*, 2009).

2.8 Kerangka Konseptual

Kerangka konsep penelitian ini seperti pada Gambar 2.7.



Gambar 2.7 Kerangka konseptual penelitian

Ekstrak etanol kakao memiliki kandungan antioksidan berupa polifenol yang dapat menghambat hemolisis, dengan memberikan proteksi dan memperkuat

resistensi terhadap hemolisis. Sifat hemolitik racun ubur-ubur mengganggu membran sel dan memicu pelepasan kalium yang menghasilkan lesi seperti pori di membran sel target yang memicu osmosis koloid dan menyebabkan perubahan membran hingga mengalami kerusakan atau lisis. Dalam hal ini, senyawa antioksidan ekstrak kakao berupa senyawa epikathekin, kathekin, dan prosianidin dapat memperkuat resistensi terhadap kerusakan membran sel target berupa eritrosit.

2.9 Hipotesis Penelitian

Hipotesis pada penelitian ini adalah ekstrak etanol kakao (*Theobroma cacao* L.) berpotensi dalam menghambat kerusakan eritrosit yang diinduksi racun *Physalia utriculus* secara *in vitro*.

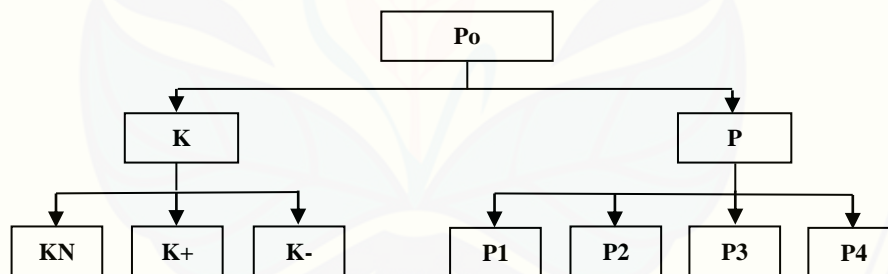
BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian *true experimental* yaitu peneliti dapat mengontrol semua variabel luar yang mempengaruhi jalannya eksperimen. Ciri utama dari penelitian *true experimental* ialah sampel yang digunakan untuk eksperimen maupun sebagai kelompok kontrol diambil secara acak dari populasi tertentu (Sugiyono, 2010).

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan ialah *post test only control group design*, yaitu penilaian hanya dilakukan setelah mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak kakao. 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 gambar :

Po : Populasi

K : Kelompok kontrol, terdiri dari KN (*Protein bovine serum*), K+ (*N-acetyl Cysteine* dan racun *Physalia utriculus*), K- (racun *Physalia utriculus*)

P : Kelompok perlakuan berupa eritrosit 1% diberi ekstrak etanol kakao P1 (0,2%), P2 (0,1%), P3 (0,04%), dan P4 (0,02%) kemudian dipapar racun *Physalia utriculus*

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1 Populasi Penelitian

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini ialah *whole blood* 3 ml. Darah yang digunakan diambil dari manusia sehat dengan golongan darah O,

berusia 21 tahun, dan tidak memiliki riwayat penyakit malaria, anemia, polisitemia vera, leukimia, hemofilia, sepsis, penyakit hiperkoagulan, *Idiopathic Thrombocytopenic Purpura*, dan trombositopenia.

3.3.2 Sampel Penelitian

Sampel adalah sebagian atau wakil populasi yang akan diteliti (Arikunto, 1997). Sampel penelitian yang digunakan ialah eritrosit manusia (hRBC) dengan jumlah sampel yang digunakan sebanyak 28 sampel sesuai dengan rumus Federer sebagai berikut.

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

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

$$6(r-1) \geq 15$$

$$(r-1) \geq 15/6$$

$$(r-1) \geq 2,5$$

$$r \geq 3,5$$

Keterangan: t = jumlah perlakuan, r = jumlah replikasi

Penelitian ini terdiri dari 7 perlakuan yang terbagi atas 1 kelompok kontrol normal, 1 kelompok kontrol positif, 1 kelompok negatif, dan 4 kelompok perlakuan dengan minimal 3,5 atau dibulatkan menjadi 4 replikasi tiap kelompok perlakuan. Sehingga didapatkan jumlah keseluruhan sampel pada penelitian ini adalah 28 sampel.

3.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Jember, Laboratorium Farmakologi Klinik dan Komunitas Fakultas Farmasi Universitas Jember, dan Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember. Waktu pelaksanaan adalah Bulan Desember 2018 hingga Januari 2019.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak etanol kakao yang dibagi menjadi empat konsentrasi berbeda, yaitu 0,02%, 0,04%, 0,1%, dan 0,2%.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini yaitu kecepatan lisis eritrosit manusia dengan menggunakan *inverted Olympus microscope CKX31*.

3.5.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini yaitu jenis dan konsentrasi racun *Physalia utriculus*, pembuatan ekstrak etanol kakao (*Theobroma cacao* L.), suhu, pH, waktu inkubasi, jenis hRBC, ringer laktat, *protein bovine serum*, *N-acetyl cysteine*, dan cara pengamatan.

3.6 Definisi Operasional

Definisi operasional pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Definisi operasional

No.	Variabel	Definisi Operasional	Hasil Ukur	Skala Ukur
1.	Ekstrak etanol kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	Ekstrak etanol kakao yang dibuat dari bubuk kakao dari Unit Produksi “Aneka Food” Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia di Jember dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Konsentrasi ekstrak etanol kakao 0,02%, 0,04%, 0,1%, 0,2%	Konsentrasi ekstrak kakao (%)	Rasio
2.	Racun ubur-ubur <i>Physalia utriculus</i>	Racun ubur-ubur <i>Physalia utriculus</i> yang didapatkan dari Pantai Papuma, Jember berupa kristal racun yang dilarutkan dalam akuades dengan konsentrasi yang dikehendaki sebanyak 100 mg/ml	Kadar racun 100 mg/ml	Rasio
3.	Kerusakan eritrosit	Kerusakan eritrosit merupakan perubahan gambaran morfologi eritrosit meliputi <i>blebbing membrane</i> , edema, dan lisis	Kecepatan lisis eritrosit (detik)	Rasio

3.7 Alat dan Bahan Penelitian

3.7.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *micropipet*, *eppendorf micropipet tube*, *microsentrifuge tube*, *blood collect ACD tube*, aluminium foil, vortex, spuit 3 ml, kapas, handscoon, tourniquet, lemari pendingin (dengan suhu 4°C), *sentrifuge*, neraca analitik, mortar, *Olympus inverted microscope CKX31*, laptop, inkubator, dan kamera AmScope MU500-HS.

3.7.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kristal racun *Physalia utriculus*, ekstrak etanol kakao 20%, *whole blood*, ringer laktat, *N-acetyl cysteine*, akuades, dan PBS.

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Uji Kelayakan Etik

Subjek yang digunakan dalam penelitian ini adalah darah manusia sehingga dalam pelaksanaannya memerlukan uji kelayakan dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

3.8.2 Persiapan Racun Ubur-ubur (*Physalia utriculus*)

Kristal racun ubur-ubur yang didapatkan dari ekstraksi racun ubur-ubur *Physalia utriculus* menggunakan metode autolisis ditimbang sebanyak 100 mg menggunakan neraca analitik lalu dilarutkan dalam akuades sebanyak 1000 ml untuk membentuk konsentrasi racun 100 mg/ml. Larutan racun lalu disentrifuge dengan kecepatan 15.000 rpm dengan suhu 4°C selama 10 menit untuk mengeluarkan racun dari nematokis.

3.8.3 Ekstraksi Etanol Kakao

a. Pembuatan Ekstrak Etanol Kakao

Bubuk kakao yang didapatkan dari Unit Produksi “Aneka Food” Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia di Jember ditimbang sebanyak 1000 mg sebagai simplisia yang siap untuk dimaserasi. Maserasi dilakukan dengan merendam simplisia ke dalam pelarut etanol 70% hingga terendam seluruhnya selama ± 24 jam, kemudian disaring menggunakan kertas penyaring. Residu kembali dimaserasi dengan cara yang sama sebanyak tiga kali. Ekstrak hasil maserasi atau infiltrat yang dihasilkan ditampung dan diuapkan untuk memisahkan hasil ekstrak dengan pelarutnya. Penguapan dilakukan dengan menggunakan *Rotary evaporator* pada suhu 45°-50°C hingga pelarut habis menguap, sehingga didapatkan ekstrak kental biji kakao (*Theobroma cacao* L.) sebanyak 20%.

b. Pembuatan Seri Konsentrasi Ekstrak Etanol Kakao

Ekstrak kental kakao dibuat menggunakan larutan ringer laktat menjadi empat seri konsentrasi. Setiap seri konsentrasi dibuat dengan menambahkan larutan ringer laktat hingga volumenya menjadi 1000 ml.

3.8.4 Persiapan Pembuatan Eritrosit 1%

Whole blood diambil dari darah manusia sehat dengan golongan darah O berumur 21 tahun. Darah diambil dari pembuluh darah vena mediana cubiti. 3 ml *whole blood* yang diambil disentrifugasi 4000 putaran selama 800 detik untuk memisahkan antara plasma darah dan sel darah. Plasma yang dihasilkan diambil dengan cara aspirasi dan dibuang. Selanjutnya hanya tersisa eritrosit saja dan diambil 10 µl eritrosit ditambahkan dengan PBS untuk membentuk eritrosit 1%.

3.8.5 Pemeriksaan Hemolisis Eritrosit

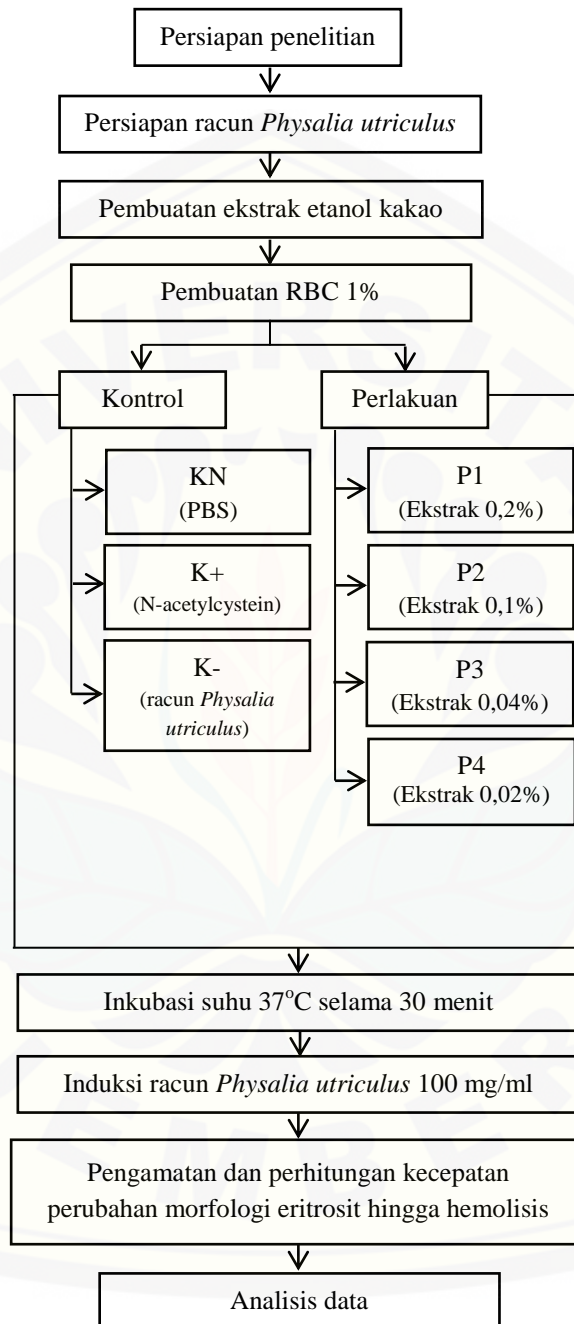
Pada kelompok kontrol normal dengan pemberian PBS pada larutan eritrosit 1%, kelompok kontrol positif (tanpa hemolisis) dengan pemberian *N-acetyl cysteine*, dan kelompok kontrol negatif (total hemolisis) dengan pemberian racun *Physalia utriculus*. Pada kelompok perlakuan dibagi menjadi empat kelompok dengan masing-masing larutan ekstrak etanol kakao pengenceran sebanyak 100, 200, 500, dan 1000 kali setara dengan konsentrasi 0,2%, 0,1%, 0,04%, dan 0,02% yang diberikan pada larutan eritrosit 1% untuk selanjutnya diinkubasi dengan suhu 37°C selama 30 menit untuk kemudian dilakukan *video time lapse microscope*, pengamatan, dan pengukuran waktu perubahan gambaran morfologi eritrosit hingga mengalami lisis menggunakan *Olympus inverted microscope CKX31* pembesaran 400x dan kamera AmScope MU500-HS. Langkah kerja pemeriksaan hemolisis eritrosit selengkapnya dapat dibaca di Lampiran 3.1.

3.9 Analisis Data

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* merupakan uji komparatif yang digunakan untuk menguji perbedaan dari lebih dari dua kelompok. Jika hasil analisis data signifikan ($p < 0,05$) dapat dilanjutkan dengan uji *post hoc* untuk mengetahui perbedaan secara signifikan antar kelompok perlakuan.

3.10 Alur Penelitian

Alur penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.2



Gambar 3.2 Alur penelitian

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

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

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian, saran yang diberikan oleh peneliti yaitu:

- a. Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai kadar komponen polifenol ekstrak kakao yang akan digunakan dalam penelitian.
- b. Perlu adanya uji untuk menilai kadar kafein pada ekstrak etanol kakao.
- c. Perlu penggunaan metode yang lebih tepat untuk memilah eritrosit dengan kualitas yang sama

DAFTAR PUSTAKA

- Ackar, D., K. V. Landic, M. Valek, D. Subaric, B. Milicevic, J. Babic, dan H. Nedic. 2013. Cocoa polyphenols : can we consider cocoa and chocolate as potential functional food. *Journal of Chemistry*. 13 : 289-296.
- Afoakwa, E. O., J. Quao, F. S. Takrama, A. S. Budu, dan F. K. Saalia. 2012. Changes in total polyphenols, o-diphenols and anthocyanin concentration during fermentation of pulp pre-conditional cocoa (*Theobroma cacao L.*). *International Food Research Journal*. 19 (3): 1071-1077.
- Alam, J. M. dan Qasim, R. 1991. Toxicology of Physalia's (portuguese man-o-war) venom. *Pakistan Journal of Pharmaceutical*. 4: 159-168.
- Alvian, M., E. Spanier, dan B. Galil. 1995. Nematocyst of *Rophilema nomadica* (Scyphozoa: Rhizostomeae). An imigrant jellyfish in the Eastern Mediterranean. *J. Morphol.* 224-231
- Andreas-Lacueva C., M. Monagas, N. Khan, M. Izquierdo-Pulido, M. Urpi-Sarda, J. Permanyer, dan R. M. Lamuela-Raventos. 2008. Flavanol and flavonol contents of cocoa powder product: influence of the manufacturing process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56 (9): 3111-3117.
- Arikunto, Suharsimi. 1997. *Prosedur Penelitian Suatu Pendekatan Praktek*. Jakarta: Rineka Cipta.
- Atikah, A. R., H. S. Budi, dan T. Kusumaningsih. 2016. Antibacterial effect of 70% ethanol and water extract of cacao beans (*Theobroma cacao L.*) on *Aggrebacter actinomycetemcomitans*. *Dental Journal*. 49 (2): 104-109.
- Bakta, I. M. 2006. *Hematologi Klinik Ringkas*. Jakarta: EGC.
- Bhakdi, S. dan Tranum-Jensen, J. 1988. Damage to cell membranes by pore-forming bacterial cytolysins. *Prog. Allergy*. 40: 1-43.
- Biology 3B Laboratory Invertebrata. 2010. *Phylogenetic Tree of the Multicelullar Animals*.
http://evolution.unibas.ch/teaching/blockkurs_zoologie/elba_lectures/11_Porifera_Cnidaria.pdf. [3 Januari 2019]
- Bouillon, J., M.D. Medel, F. Pages, J.M. Gili, F. Boero, dan C. Gravili. 2004. Fauna of the Mediterranean Hydrozoa. *Scientia Marina*. 68 (2): 5-438.
- Brodeur, R. D., C. E. Mills, J. E. Overland, G. E. Walters, dan J. D. Schumacher. 1999. Evidence for a substantial increase in gelatinous zooplankton in the bering sea, with possible links to climate change. *Fisheries Oceanography*. 8 (4): 296-306.

- Burnett, J. W. dan Calton, G. J. 1987. Venomous pelagic coelenterates: chemistry, toxicology, immunology and treatment of their stings. *Toxicon*. 25: 581-602.
- Burnett, J. W. dan Calton, G. J. 1987. Jellyfish envenomation syndromes update. *Ann. Emerg. Med.* 16: 117-122.
- Burnett, J. W. dan Gable, W. D. 1989. A fatal jellyfish envenomation by the portuguese man-o-war. *Toxicon*. 27: 823-824.
- Cawley, J. 2009. *Look out! jellyfish hordes back for another summer*, s.l.: Daily Press.
- Cegolon, L., W. C. Heymann, J. H. Lange, dan G. Mastrangelo. 2013. Jellyfish stings and their management: a review. *Marine Drugs*. 11: 523-550.
- Cheng, D., A. J. Dattaro, dan R. Yakobbi. 2007. Jellyfish stings. *Med. J. Aust.*
- Chin, E., K. B. Miller, M. J. Payne, W. J. Hurst, dan D. A. Stuart. 2013. Comparison of antioxidant activity and flavanol content of cocoa beans processed by modern and traditional mesoamerican methods. *Heritage Science*. 1: 1-7.
- Chung, J. J., L. A. Ratnapala, I. M. Cooke, dan A. A. Yanagihara. 2001. Partial purification and characterization of a hemolysin (CAH1) from Hawaiian box jellyfish (*Carybdea alata*) venom. *Toxicon*. 39: 981-990.
- Cooper, K. A., E. Campos-Gimenez, D. J. Alvarez, K. Nagy, J. L. Donovan, dan G. Williamson. 2007. Rapid reversed phase ultra-performance liquid chromatography analysis of the major cocoa polyphenols and interrelationships of their concentration in chocolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 2841-2847.
- Counet, C., C. Ouwerx, D. Rosoux, dan S. Collin. 2004. Relationship between procyanidin and flavor contents of cocoa liquors from different origins. *J. Agric. Food Chem.* 52 : 6243– 6249.
- Dalle-Donne, I., R. Rossi, R. Colombo, D. Glustarini, A. Milzani. 2006. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry*. 52: 601-623.
- Daniel, G. dan Mani, S. 2016. Quantitative estimation of plant metabolites in ethanolic seed extracts of *Theobroma cacao* (L.) and *Coffea arabica* (L.). *International Journal of Chemical Studies*. 4 (4): 130-134.
- Daubert, G.P. 2008. Cnidaria Envenomation. <http://medicine.Medscape.com/article/769538-overview>.

- 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.
- Engler, M. B. dan Engler, M. M., 2004. The vasculoprotective effects of flavonoid-rich cocoa and chocolate. *Nutrition Research*. 24: 695-706
- Gembong, T. 1988. *Taksonomi Tumbuhan Spermatopita*. Yogyakarta: UGM Press
- Gershwin, L., W. Zeidler, dan P. J. F. Davie. 2010. Medusae (*Cnidaria*) of moreton bay, Queensland, Australia. *Memoirs of the Queensland Museum-Nature*. 54(3)
- Goggin, L., L. Gershwin, P. Fenner, J. Seymour, dan T. Carrette. 2004. Stinging jellyfish in tropical Australia. *CRC Reef Research Center*.
- Goldsmith, L. A., S. I. Katz, B. A. Gilcrest, A. S. Paller, D. J. Leffel, dan K. Wolff. 2012. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. s.l.:McGraw-Hill.
- Haryati, S. 2005. Standarisasi Ekstrak Tumbuhan Obat Indonesia Salah Satu Tahapan Penting dalam Pengembangan Obat Asli Indonesia. Info POM
- Hii, C. I., C. L. Law, S. Suzannah, J. Misnawi, dan M. Cloke. 2009. Polyphenols in cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Asian Journal of Food and Agro-Industry*. 2(4): 702-722.
- Hoover, M. 2004. Marine invertebrate of Bermuda, portuguese man-of-war (*Physalia physalis*). *Hawaii Medical Journal*. 4: 193-194.
- Hussain, N. 2015. Effect of different solvents on phytosterols and antioxidant activity of cocoa beans, *International Journal of Food Engineering*. 1 (1): 15-20.
- Indraeni, A. 2009. "Identifikasi Spesies Ubur-Ubur Beracun di Pantai Papuma, Kecamatan Ambulu, Kabupaten Jember Berdasarkan Gambaran Morfologi, Jember". Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember: Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
- 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.
- King, R. 2003. The portuguese man-of-war (*Physalia physalis*). *South Carolina Departement of Natural Resources*.
- Kizner, K. W. 1984. Decompression sickness or portuguese man-o-war envenomation?. *Wilderness Medicine*. 1: 7-8.

- Kramp, P. L. 1961. Synopsis of the medusae of the world. *Journal of the Marine Biological Association of The United Kingdom*. 1(40): 292-303.
- Kumari, I. P. N. P. dan D. C. Abeysinghe. 2011. Phenolic content and antioxidant capacity of beans, bean husk, and pod husks of cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Proceedings of 11th Agricultural Research Symposium*. 362-366.
- Kyi, T. M., W. R. W. Daud, A. B. Mohammad, M. W. Samsudin, A. A. H. Kadhum, dan M. Z. M. Talib. 2005. The kinetics of polyphenol degradation during the drying of Malaysian cocoa beans. *Int. J. Food Sci. Technol.* 40 : 323–331.
- Larasati, D. M., A. Munawir, dan R. Prasetyo. 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 MC 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., P. Kumar, P. Chandra. 2015. Biomarkers of oxidative stress in erythrocytes as a function of human age. *World Journal of Methodology*. 5 (4): 216-222.
- Meng, C. C., A. M. M. Jalil, dan A. Ismail. 2009. Phenolic and theobromine contents of commercial dark, milk, and white chocolates on malaysian market. *Molecules*. 14: 200-209.
- Mills, C. E. 2001. Jellyfish blooms: are populations increasing globally in response to changing ocean condition?. *Hydriobiologia*. 55-68.
- Montgomery, J. Seys, dan J. Mees. 2016. To pee, or not to pee: a review on envenomation and treatment in European jellyfish species. *Marine drugs*. 14: 127.
- Mujiono, N. 2010. Jellyfish sting: an Indonesian case report. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. 2: 1.
- Mulato, S., S. Widyotomo, dan Handaka. 2006. Disain teknologi pengolahan pasta, lemak, dan bubuk coklat untuk kelompok tani. *Puslit Kopi dan Kakao Indonesia*

- Nazaruddin, R., L. K., O. Hassan, dan M. Said 2006. Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma Cacao*) during fermentation. *Ind. Crops Prod.* 24 : 87–94.
- Ningsih, Dwi, dan Pamuji, Gunawan. 2009. Potensi *Propolis Trgona spp.* Pandeglang sebagai pemacu pertumbuhan pada sapi peranakan Ongele. *Skripsi. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.*
- Price, S. A. dan Wilson, L. M. 2005. *Patofisiologi konsep klinis Proses-Proses Penyakit.* Jakarta: EGC.
- Purcell, J. E. 2005. Climate effect on formation of jellyfish and *Ctenophore* blooms: a review. *Journal of Marine Biology Association of United Kingdom.* 461-476.
- Pusat Penelitian Kopi dan Kakao. 2010. *Buku Pintar Budidaya Kakao.* Jakarta: Agro Media Pustaka.
- Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia. 2004. *Panduan Lengkap Budidaya Kakao.* Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Sinaga, E. 2009. Mengenal dan Memanfaatkan Tumbuhan Obat untuk Pemeliharaan Kesehatan Sehari-hari. *Pusat Penelitian dan Pengembangan Tumbuhan Obat Universitas Nasional.*
- Siregar, T., S. Riyadi, dan L. Nuraeni. 1989. *Budidaya, Pengolahan, dan Pemasaran Coklat.* Jakarta: Penebar Swadaya.
- Stein, M. R., J. V. Marraccini, N. E. Rothschild, dan J. W. Burnett. 1989. Fatal portuguese man-o'-war (*Physalia physalis*) envenomation. *Annals of Emergency Medicine.* 18(3): 312-315.
- Sugiyono. 2014. *Statistika untuk Penelitian.* Bandung: ALFABETA
- Suput, D. 2009. In vivo effect of *Cnidaria* toxins and venoms. *Toxicon.* 54: 1190-1200.
- Tamkun, M. M. dan Heissinger, D. A. 1981. Isolation and partial characterization of a hemolytic and toxic protein from the nematocyst venom of portuguese man of war *P. physalis.* *Biochemical Biophys.*
- Tibbals, J. 2006. Australian venomous jellyfish, envenomation syndromes, toxins and therapy. *Toxicon.* 48: 830-859.
- Uye, S. 2008. Blooms of the giant jellyfish *Nemopilema nomurai*: a threat to the fisheries sustainability of the East Asian marginal seas. *Plankton Bethos Research.* 3: 125-131.

- Weisburger, J. H. 2001. Chemo preventive effects of cocoa polyphenols on chronic diseases. *Exploraton Biology and Medicine*. 10(226): 891-897.
- Whitaker, D., R. King, dan K. David, 2005. Jellyfish an information. *Pasific Bull. Mar, Sci*.
- Wilcox, C. L., J. L. Headlamp, T. K. Doyle, dan A. A. Yanagihara. 2017. Assesing the efficacy of first-aid measures in *Physalia sp.* envenomation, using solution and blood agarose-based models. *Toxins*. Vol. 9: 149.
- Williamson J. A., P. J. Fenner, J. W. Burnett, dan J. F. Rifkin. 1996. The injuries, their incidence and the toxins that produce them. Sydney: University of New South Wales Press.
- Wollgast, J. dan Anklam, E. 2000. Review of polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*. 33: 423-447.
- Yanagihara, A. A. dan Shohet, R. V. 2012. Cubozoan venom-induced cardiovascular collapse is caused by hypercalemia and prevented by zinc gluconate in mice. *Plose One*. 12(7): 1-12.
- Yanagihara, A. A., J. M. Y. Kuroiwa, L. M. Oliver, dan D. D. Kunkel. 2002. Ulfastructure of a novel eurytele nematocyst of *Carybdea alata reynaund* (Cubozoa, Cnidaria). *Cell Tissue Res*. 308: 307-318.
- Yanagihara, A. A. 2013. Zinc-containing compositions for the treatment of disease, illnesses, and syndromies associated with exposure to pore forming toxins. *United States Patent Application Publication*. 1-13.

LAMPIRAN

Lampiran 3.1 Pemeriksaan Hemolisis

TEKNIK PEMERIKSAAN HEMOLISIS

- a. Pada kelompok kontrol normal (tanpa hemolisis) dengan pemberian PBS pada larutan eritrosit 1% sebanyak 900 μ l
- b. Pada kelompok kontrol positif dengan pemberian *N-acetylcystein* pada larutan eritrosit 1% sebanyak 900 μ l
- c. Pada kelompok kontrol negatif dengan pemberian racun *Physalia utriculus* 100 mg/ml
- d. Pada perlakuan pertama dengan pemberian 100 mg/ml toksin *Physalia utriculus* sebanyak 50 μ l pada larutan eritrosit 1% sebanyak 100 μ l yang telah dicampur dan diinkubasi dengan 900 μ l kakao pengenceran 100X atau setara dengan konsentrasi kakao 0,2%
- e. Pada perlakuan kedua dengan pemberian 100 mg/ml toksin *Physalia utriculus* sebanyak 50 μ l pada larutan eritrosit 1% sebanyak 100 μ l yang telah dicampur dan diinkubasi dengan 900 μ l kakao pengenceran 200X atau setara dengan konsentrasi kakao 0,1%
- f. Pada perlakuan ketiga dengan pemberian 100 mg/ml toksin *Physalia utriculus* sebanyak 50 μ l pada larutan eritrosit 1% sebanyak 100 μ l yang telah dicampur dan diinkubasi dengan 900 μ l kakao pengenceran 500X atau setara dengan konsentrasi kakao 0,04%
- g. Pada perlakuan keempat dengan pemberian 100 mg/ml toksin *Physalia utriculus* sebanyak 50 μ l pada larutan eritrosit 1% sebanyak 100 μ l yang telah dicampur dan diinkubasi dengan 900 μ l kakao pengenceran 1000X atau setara dengan konsentrasi kakao 0,02%

Selanjutnya dilakukan *video time lapse microscope*, pengamatan dan pengukuran waktu perubahan gambaran morfologi eritrosit hingga mengalami

lisis menggunakan *Olympus inverted microscope* CKX31 pembesaran 400x dan kamera AmScope MU500-HS.



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 : tk_unej@telkom.net

KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK
ETHICAL APPROVA
Nomor : ~~127~~ /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 KAKAO (*Theobroma cacao* L.) DALAM MENGHAMBAT HEMOLISIS ERITROSIT YANG DIINDUKSI RACUN *Physalia utriculus* SECARA *IN VITRO*

Nama Peneliti Utama : Adinngtyas Intansari.
Name of the principal investigator

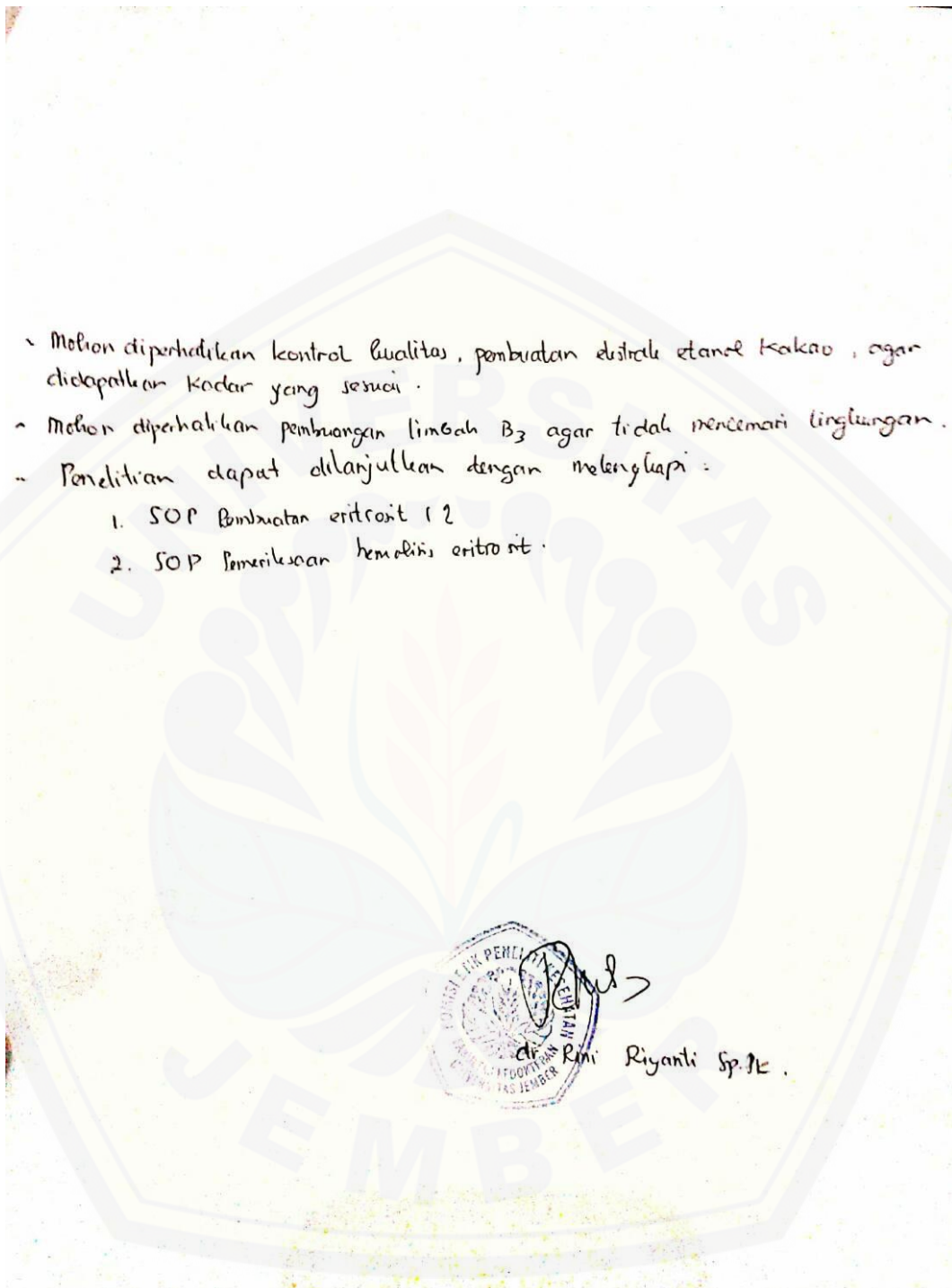
NIM : 152010101103

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Name of institution

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

Jember, 28 - 01 - 2019
Ketua Komisi Etik Penelitian

dr. Rini Riyanti, Sp.PK



Lampiran 3.3 Lembar Persetujuan (*Informed consent*)**INFORMED CONSENT****PENJELASAN MENGENAI PENELITIAN POTENSI EKSTRAK ETANOL KAKAO (*Theobroma cacao* L.) DALAM MENGHAMBAT KERUSAKAN ERITROSIT YANG DIINDUKSI RACUN *Physalia utriculus* SECARA *IN VITRO***

Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Jember (Adinningtyas Intansari: 152010101103) sedang melakukan penelitian untuk mengetahui apakah terdapat hubungan antara konsentrasi ekstrak etanol kakao (*Theobroma cacao* L.) dalam menghambat kerusakan eritrosit yang diinduksi racun *Physalia utriculus* secara *in vitro*. Penelitian ini melibatkan seorang subjek penelitian untuk diambil darah venanya. Subjek penelitian tersebut harus memenuhi beberapa kriteria yaitu usia 21 tahun, golongan darah O, dan tidak memiliki riwayat penyakit malaria, anemia, polisitemia vera, leukimia, hemofilia, sepsis, penyakit hiperkoagulan, *Idiopathic Thrombocytopenic Purpura*, trombositopenia.

Saudara memenuhi kriteria yang telah ditetapkan oleh peneliti. Sehingga peneliti meminta Saudara untuk menjadi sukarelawan dalam penelitian ini. Saudara akan diminta untuk mengisi *informed consent* dan menjawab beberapa pertanyaan penelitian tentang identitas dan riwayat kesehatan Saudara, kemudian mengikuti prosedur penelitian ini.

Perlakuan yang akan Saudara terima dimulai dari wawancara karakteristik berupa nama, usia, serta riwayat penyakit Saudara. Selanjutnya Saudara akan diambil darah venanya menggunakan jarum dan tabung vacutainer. Pengambilan darah hanya dilakukan satu kali pengambilan.

Saudara bebas menolak untuk ikut dalam penelitian ini. Apabila Saudara telah memutuskan untuk ikut, Saudara juga bebas untuk mengundurkan diri setiap saat. Semua data penelitian ini akan diperlakukan secara rahasia sehingga tidak memungkinkan orang lain mengetahui dan memanfaatkan data tersebut.

Saudara akan diberi kesempatan untuk menanyakan semua hal yang belum jelas sehubungan dengan penelitian ini. Bila sewaktu-waktu Saudara membutuhkan penjelasan, Saudara dapat menghubungi Adinningtyas Intansari, mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Jember pada nomor 085708076745.

PERNYATAAN PERSETUJUAN
(Informed Consent)

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama :

Alamat :

Usia :

No.HP :

Menyatakan bersedia untuk menjadi subyek penelitian dari:

Nama : Adinningtyas Intansari

Angkatan/NIM : 2015/152010101103

Fakultas : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

dengan judul penelitian “Potensi Ekstrak Etanol Kakao (*Theobroma cacao* L.) dalam Menghambat Kerusakan Eritrosit yang Diinduksi Racun *Physalia utriculus* Secara *In Vitro*”.

Saya telah diberikan penjelasan mengenai hal tersebut di atas dan saya telah diberikan kesempatan untuk bertanya mengenai hal-hal yang belum dimengerti dan telah mendapatkan jawaban yang jelas dan benar.

Dengan ini saya menyatakan secara sukarela untuk ikut sebagai subyek dalam penelitian ini.

Jember, 2018

Subyek Penelitian
(Sukarelawan)

(.....)

Lampiran 3.4 Surat Rekomendasi Bebas Plagiasi



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN

Jl. Kalimantan 1/37 Kampus Tegal Boto. Telp. (0331) 337877, Fax (0331) 324446
Jember 68121.

REKOMENDASI BEBAS PLAGIASI

Nomor : 60 /H25.1.11/KBSI/2019

Komisi bimbingan Skripsi dan Ilmiah, Fakultas Kedokteran Universitas Jember dalam upaya peningkatan kualitas dan originalitas karya tulis ilmiah mahasiswa berupa skripsi, telah melakukan pemeriksaan plagiasi atas skripsi yang berjudul :

POTENSI EKSTRAK KAKAO (*THEOBROMA CACAO* L.) DALAM MENGHAMBAT HEMOLISIS ERITROSIT YANG DIINDUKSI RACUN *PHYSALIA UTRICULUS* SECARA *IN VITRO*

Nama Penulis : Adiningtyas Intansari
NIM. : 152010101103
Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Telah menyetujui dan dinyatakan "BEBAS PLAGIASI"

Surat Rekomendasi ini dapat digunakan sebagaimana mestinya.



Jember, 25 Januari 2019
Ketua Komisi Bimbingan Skripsi & Ilmiah

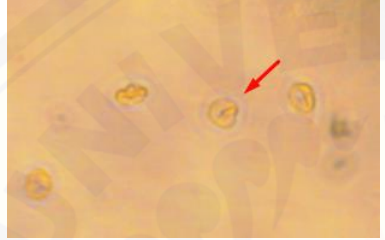
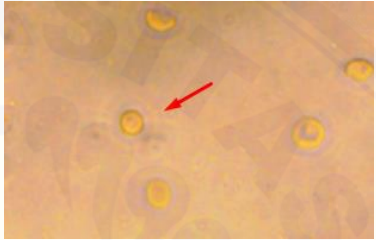


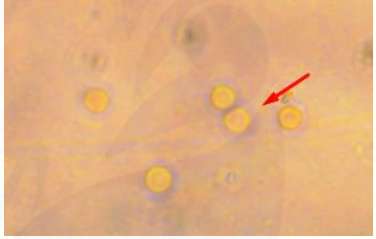
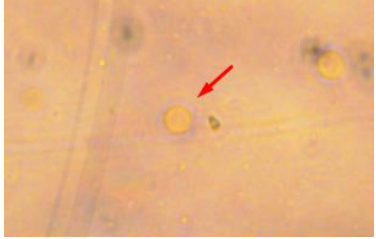

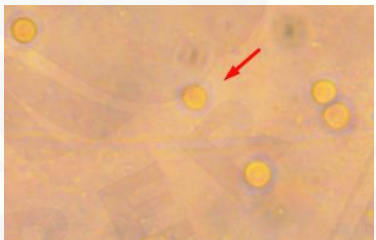
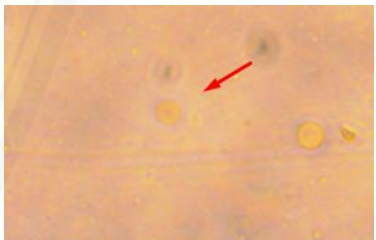
Dr. Yunita Armiyanti, M.Kes
NIP. 19740604 200112 2 002

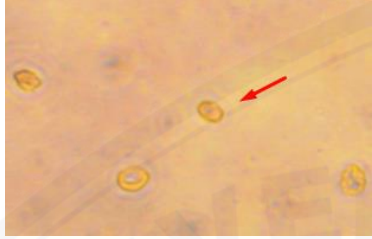
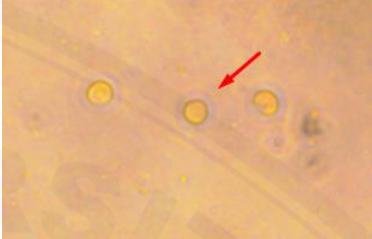
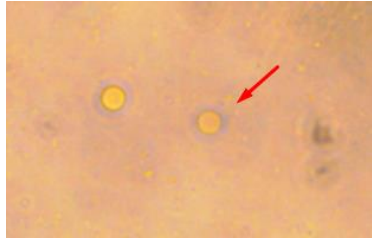
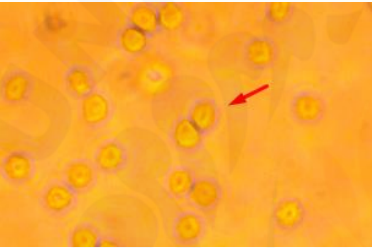
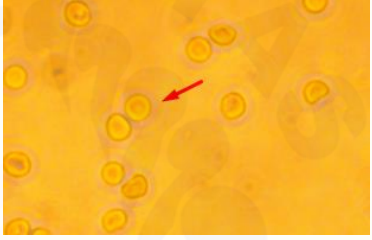
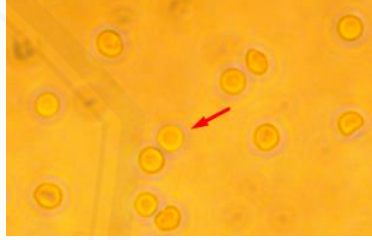
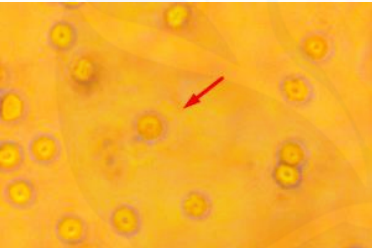
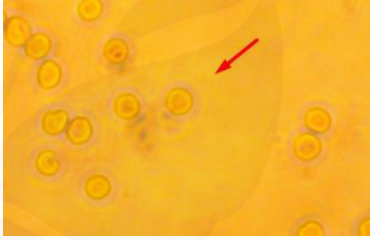
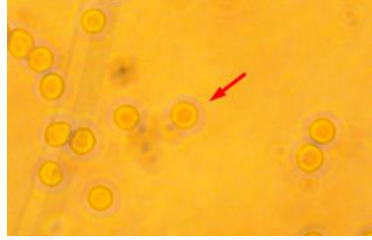
Lampiran 4.1 Data Kecepatan Lisis Eritrosit Setiap Kelompok

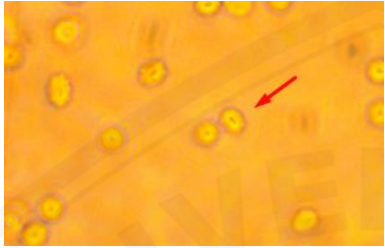
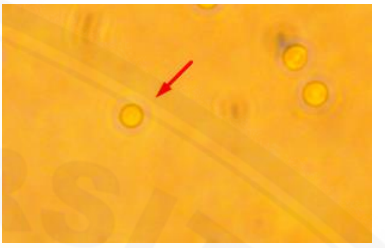
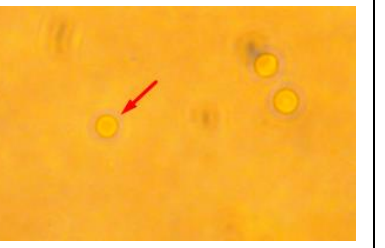
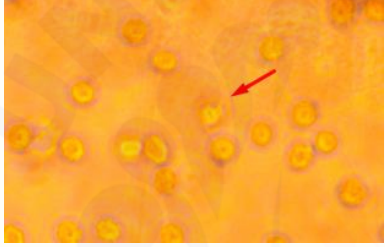

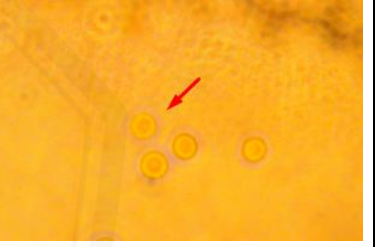



Kelompok Perlakuan	Sampel	Kerusakan Eritrosit (detik)			
		Blebbing	Edema	Mulai lisis	Lisis total
Kakao 0,2%	P1.1	0	684	735	762
	P1.2	0	774	843	860
	P1.3	0	843	957	965
	P1.4	0	801	898	919
	Rata-rata		775.5	858.25	876.5
Kakao 0,1%	P2.1	0	786	800	932
	P2.2	0	1030	1119	1085
	P2.3	0	944	959	987
	P2.4	0	970	1145	1168
	Rata-rata		932.5	1005.75	1043
Kakao 0,04%	P3.1	0	602	705	726
	P3.2	0	653	658	669
	P3.3	0	627	672	696
	P3.4	0	658	679	702
	Rata-rata		635	678.5	698.25
Kakao 0,02%	P4.1	0	786	801	812
	P4.2	0	1030	1119	1131
	P4.3	0	944	959	987
	P4.4	0	970	1145	1168
	Rata-rata		932.5	1006	1024.5
Kontrol negatif	K-.1	0	604	847	853
	K-.2	0	970	1168	1192
	K-.3	0	922	1162	1170
	K-.4	0	647	923	930
	Rata-rata		785.75	1025	1036.25

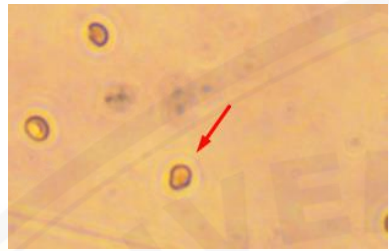
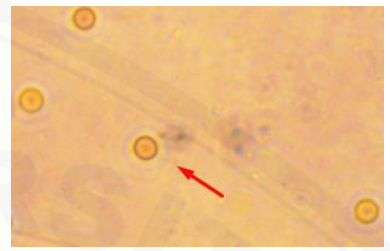
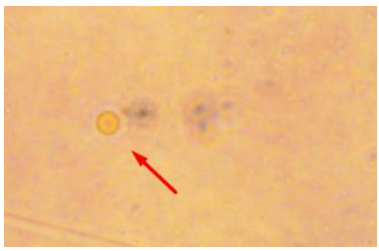
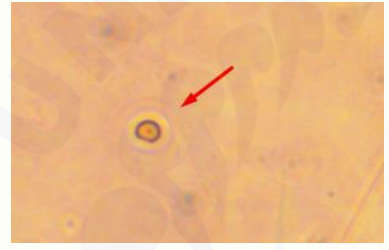
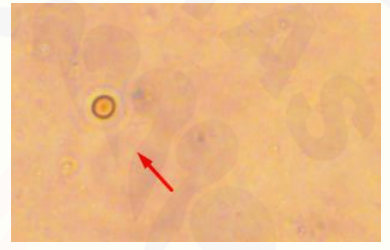
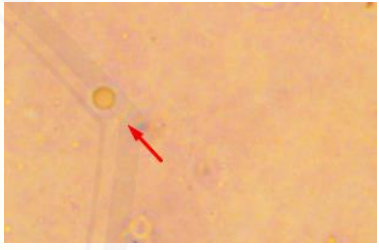



Kelompok Perlakuan	Sampel	Lisis	Rata-rata \pm Standar deviasi
Kontrol Negatif	K-.1	847	1025 \pm 164,63
	K-.2	1168	
	K-.3	1162	
	K-.4	923	
Kakao 0,2%	P1.1	735	858.25 \pm 94,44
	P1.2	843	
	P1.3	957	
	P1.4	898	
Kakao 0,1%	P2.1	800	1005.75 \pm 159,93
	P2.2	1119	
	P2.3	959	
	P2.4	1145	
Kakao 0,04%	P3.1	705	678.5 \pm 19,71
	P3.2	658	
	P3.3	672	
	P3.4	679	
Kakao 0,02%	P4.1	801	1006 \pm 159,50
	P4.2	1119	
	P4.3	959	
	P4.4	1145	

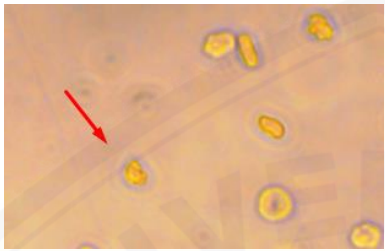
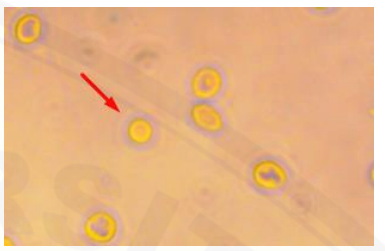
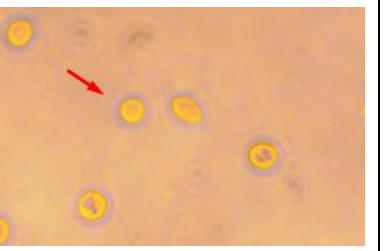
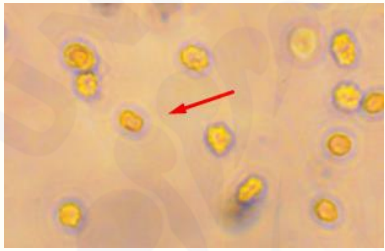
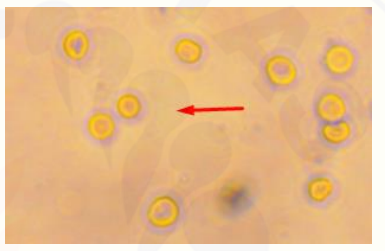
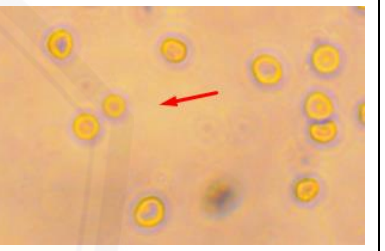
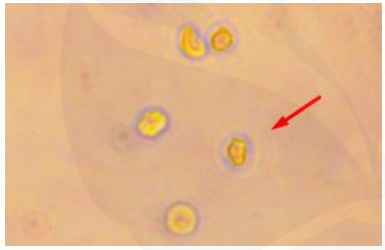
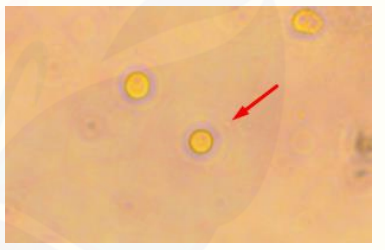
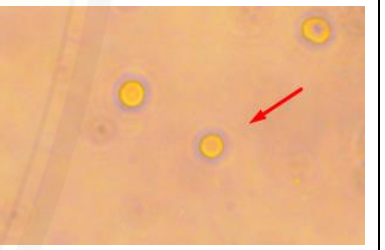
Lampiran 4.2 Gambaran Perubahan Morfologi Eritrosit

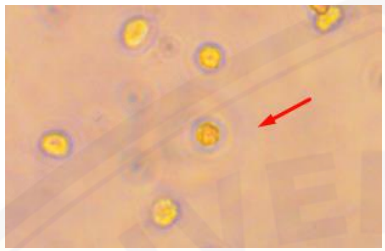
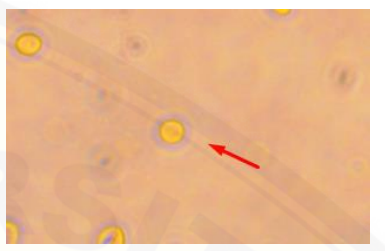
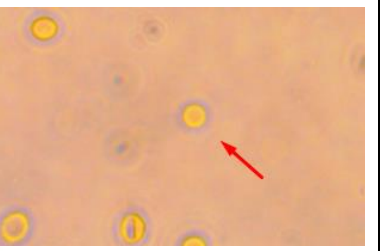
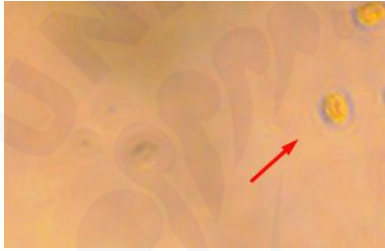
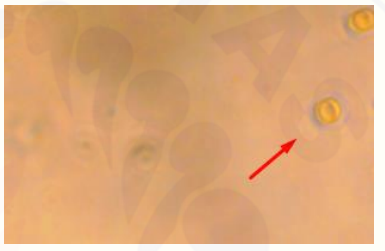
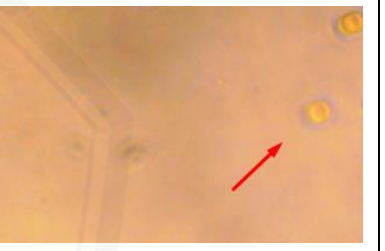
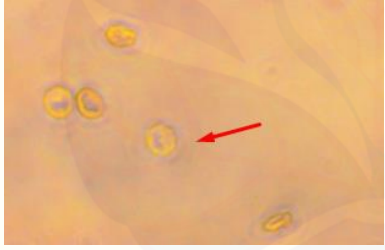
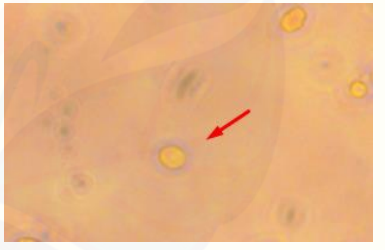
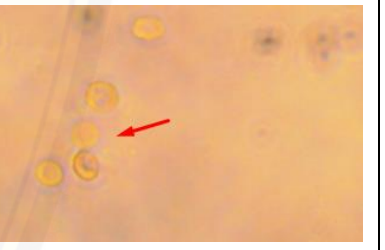
Kelompok Perlakuan	Sampel	Blebbing	Edema	Mulai lisis
Kontrol Negatif	K-.1			
	K-.2			
	K-.3			

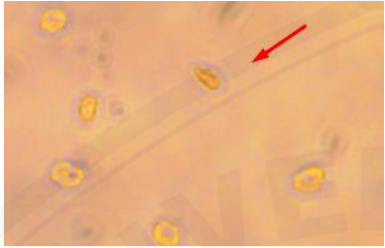
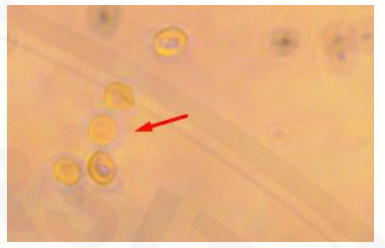
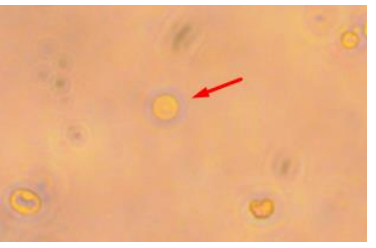
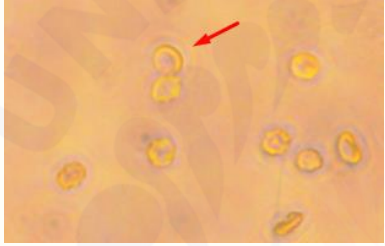
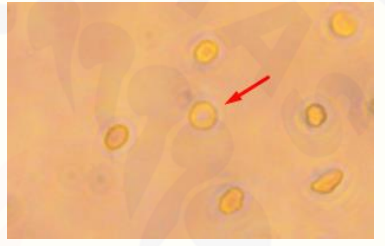
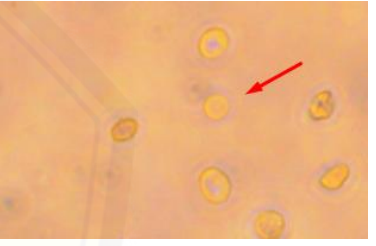
	K-4			
Kakao 0,2%	P1.1			
	P1.2			

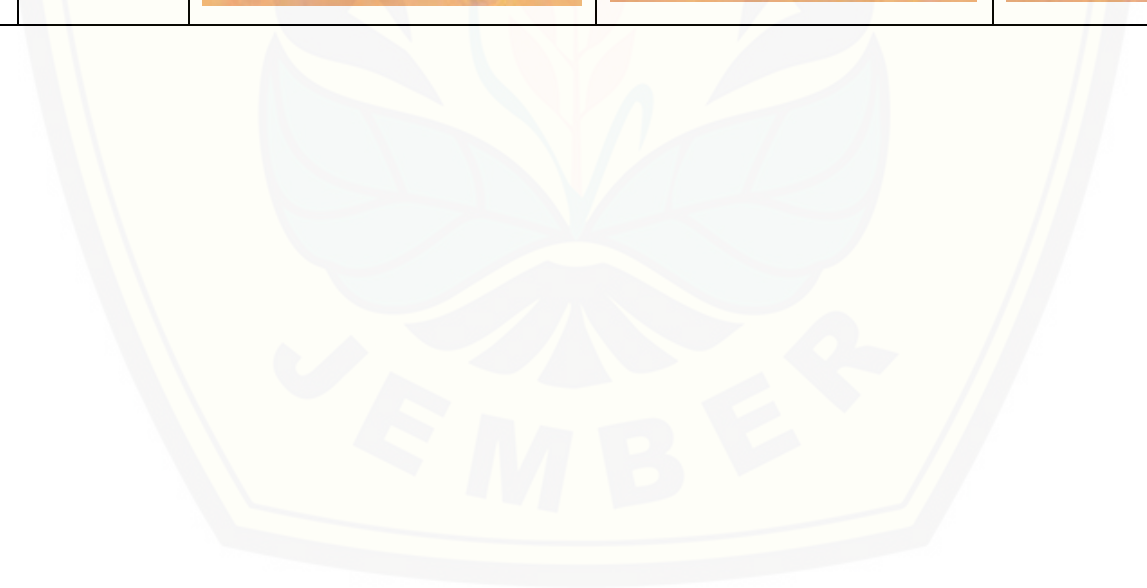
	P1.3			
	P1.4			
Kakao 0,1%	P2.1			

P2.2			
P2.3			
P2.4			

Kakao 0,04%	P3.1			
	P3.2			
	P3.3			

	P3.4	 Micrograph showing several yellowish circular structures with blue outlines. A red arrow points to one of these structures.	 Micrograph showing several yellowish circular structures with blue outlines. A red arrow points to one of these structures.	 Micrograph showing several yellowish circular structures with blue outlines. A red arrow points to one of these structures.
Kakao 0,02%	P4.1	 Micrograph showing several yellowish circular structures with blue outlines. A red arrow points to one of these structures.	 Micrograph showing several yellowish circular structures with blue outlines. A red arrow points to one of these structures.	 Micrograph showing several yellowish circular structures with blue outlines. A red arrow points to one of these structures.
	P4.2	 Micrograph showing several yellowish circular structures with blue outlines. A red arrow points to one of these structures.	 Micrograph showing several yellowish circular structures with blue outlines. A red arrow points to one of these structures.	 Micrograph showing several yellowish circular structures with blue outlines. A red arrow points to one of these structures.

P4.3			
P4.4			



Lampiran 4.3 Hasil Analisis Statistik

Uji Normalitas

	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Lisis	Kontrol negatif	.297	4	.	.834	4	.178
	Perlakuan 1	.186	4	.	.978	4	.887
	Perlakuan 2	.261	4	.	.906	4	.463
	Perlakuan 3	.240	4	.	.961	4	.787
	Perlakuan 4	.261	4	.	.906	4	.464

Uji Homogenitas

Lisis

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4.604	4	15	.013

Transformasi

Log_lisis

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.976	4	15	.054

Uji One Way Anova

ANOVA					
log_lisis					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.089	4	.022	6.195	.004
Within Groups	.054	15	.004		
Total	.142	19			

Uji Post hoc Bonferoni

Multiple Comparisons						
Dependent Variable: log_lisis						
Bonferroni						
(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol negatif	Perlakuan 1	.07486	.04232	.972	-.0642	.2139
	Perlakuan 2	.00830	.04232	1.000	-.1308	.1473
	Perlakuan 3	.17502*	.04232	.009	.0360	.3141
	Perlakuan 4	.00816	.04232	1.000	-.1309	.1472
Perlakuan 1	Kontrol negatif	-.07486	.04232	.972	-.2139	.0642
	Perlakuan 2	-.06656	.04232	1.000	-.2056	.0725
	Perlakuan 3	.10016	.04232	.318	-.0389	.2392
	Perlakuan 4	-.06670	.04232	1.000	-.2057	.0724
Perlakuan 2	Kontrol negatif	-.00830	.04232	1.000	-.1473	.1308
	Perlakuan 1	.06656	.04232	1.000	-.0725	.2056
	Perlakuan 3	.16672*	.04232	.013	.0277	.3058
	Perlakuan 4	-.00014	.04232	1.000	-.1392	.1389
Perlakuan 3	Kontrol negatif	-.17502*	.04232	.009	-.3141	-.0360
	Perlakuan 1	-.10016	.04232	.318	-.2392	.0389
	Perlakuan 2	-.16672*	.04232	.013	-.3058	-.0277
	Perlakuan 4	-.16686*	.04232	.013	-.3059	-.0278
Perlakuan 4	Kontrol negatif	-.00816	.04232	1.000	-.1472	.1309
	Perlakuan 1	.06670	.04232	1.000	-.0724	.2057
	Perlakuan 2	.00014	.04232	1.000	-.1389	.1392
	Perlakuan 3	.16686*	.04232	.013	.0278	.3059

Lampiran 4.4 Dokumentasi kegiatan penelitiana) Proses ekstraksi kakao (*Theobroma cacao* L.)

1. Persiapan simplisia kakao



2. Ekstraksi kakao

b) Pembuatan racun *Physalia utriculus* 100 mg/ml1. Persiapan racun *Physalia utriculus*2. Pelarut racun *Physalia utriculus*

3. Penimbangan kristal racun 100 mg/ml 4. Pembuatan larutan racun

Physalia utriculus

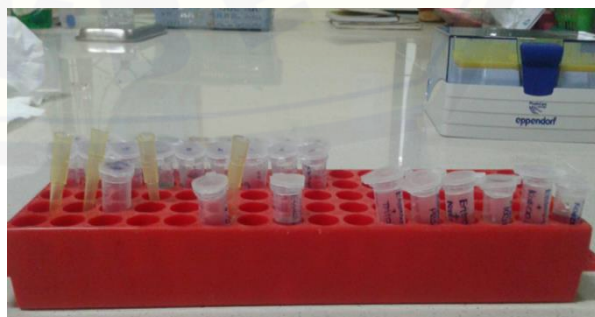


5. Larutan racun *Physalia utriculus* 100 mg/ml

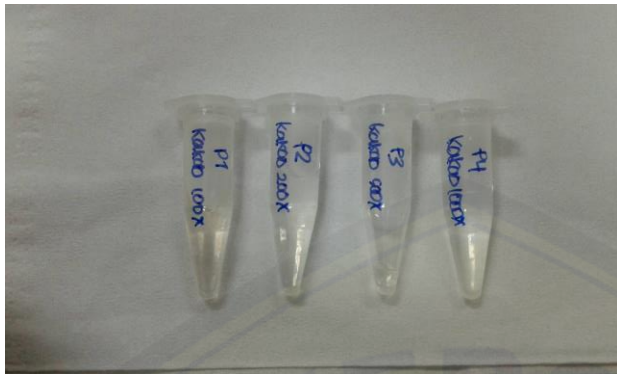


- c) Pembuatan seri konsentrasi kakao *Theobroma cacao*

1. Persiapan alat dan bahan



2. Seri konsentrasi ekstrak etanol kakao



d) Pembuatan larutan NAC 3 mg/ml



e) Persiapan dan pembuatan eritrosit 1%

1. Persiapan alat untuk pengambilan darah



2. Pengambilan darah donor 3 cc

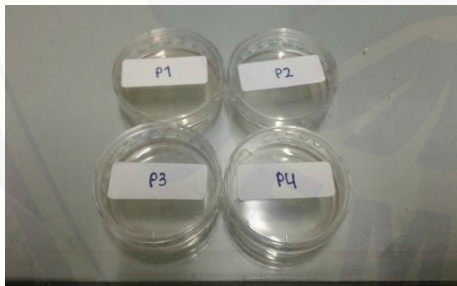
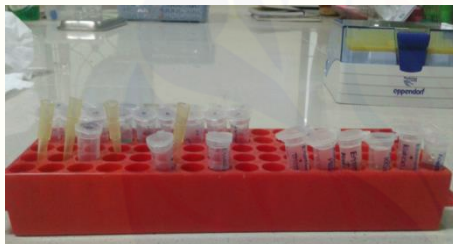


3. Pembuatan Eritrosit 1%



f) Perlakuan

1. Percobaan



2. Inkubasi media percobaan di incubator dengan suhu 37°C selama 30 menit



3. Induksi racun *Physalia utriculus*



g) Pemeriksaan hambatan hemolisis

1. Kamera AmScope MU500-HS



2. Pengamatan menggunakan *Olympus inverted microscope CKX31*



3. Tampilan aplikasi AmScope MU500-HS

