

## Pengaruh ekstrak biji kakao (*Theobroma cacao*) terhadap hepatotoksisitas parasetamol pada mencit

### Effect of cocoa (*Theobroma cacao*) seed extract against paracetamol hepatotoxicity in mice

YESSI OKTIARI, S. BAMBANG WIDJOKONGKO, LILIK WIJAYANTI

Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126, Jawa Tengah

Manuskrip diterima: 7 Juni 2010. Revisi disetujui: 24 Agustus 2010.

**Abstract.** Oktiari Y, Widjokongko SB, Wijayanti L. 2010. Effect of cocoa (*Theobroma cacao*) seed extract against paracetamol hepatotoxicity in mice. *Biofarmasi* 8: 52-57. Cocoa bean (*Theobroma cacao*) contains flavonoids, an antioxidant that can reduce oxidant from the process of metabolism of paracetamol. This metabolism creates NAPQI. This study explained the effect of cocoa bean extract to reduce the liver histologic disruption of mice (*Mus musculus*) that treated by paracetamol. This study was a laboratory experimental research with a post-test only controlled group design. The samples used in this research included forty male mice, Swiss Webster type, 2-3 months in age and  $\pm 20$  g body weight. The samples divided into 4 groups, each group consisted of ten mice. Mice for the control group (K) were not given with paracetamol and the cocoa bean extract, but they were given only with aquadest of 0.2 mL/20 g body weight of mice for 17 days serially. The first treatment group (P1) was given with paracetamol with a dose of 0.1 mL/20 g body weight of mice on the day 15, 16 and 17. The second treatment group (P2) was given with a dose of cocoa bean extract I consisted of 0.02 mL/20 g body weight of mice for 17 days serially and also paracetamol in a dose of 0.1 mL/20 g body weight of mice at day 15, 16 and 17. The third treatment group (P3) was given a dose of extract II consisted of 0.04 mL/20 g body weight of mice for 17 days serially and paracetamol in a dose of 0.1 mL/20 g body weight of mice on day 15, 16 and 17. On the 18<sup>th</sup> day, mice were sacrificed by the neck dislocation. After that, the liver slides were prepared by stained with Hematoxylin-Eosin (HE). The ANOVA One-Way results showed that there were significant differences between the four groups. The results of the LSD method showed that there were significant differences between K-P1, K-P2, K-P3 and P1-P2 groups, but there was no a significant difference between K-P3 and P2-P3 groups. Cocoa extract can reduce the histologic disruption of mice that given a toxic by paracetamol.

**Keywords:** Cacao bean extract, liver cell damage, mice, paracetamol, *Theobroma cacao*

### PENDAHULUAN

Kakao, atau juga populer dengan sebutan coklat, dikenal dan digunakan sejak ratusan tahun lalu. Kakao merupakan salah satu bahan makanan yang memiliki kandungan flavonoid tinggi (Keen 2001). Kandungan flavonoid utamanya adalah *epicatechin*, *proanthocyanidin*, dan *catechin*. Kandungan flavonoid kakao lebih tinggi daripada bahan makanan lainnya, seperti apel, bawang putih, dan anggur yang dikenal mengandung banyak flavonoid (Lamuela-Raventós et al. 2005). Flavonoid berperan sebagai antioksidan karena dapat menangkap radikal bebas (*free radical scavengers*) dengan melepaskan atom hidrogen dari gugus hidroksilnya. Pemberian atom hidrogen tersebut akan menyebabkan radikal bebas menjadi stabil sehingga tidak merusak lipid, protein, dan *deoxyribonucleic acid* (DNA) yang menjadi target kerusakan seluler (Ide 2008).

Penelitian ini membuktikan bahwa kakao memiliki manfaat kardioprotektif melalui pencegahan aktivasi platelet (Rein et al. 2000) dan vasodilatasi koroner (Flammer et al. 2007). Selain itu, kakao juga meningkatkan *fecal bulk*, serta menurunkan rasio kolesterol *Low Density Lipoprotein* (LDL)/*High Density Lipoprotein* (HDL) (Jenkins et al. 2000). Sebuah penelitian di Amerika juga

telah membuktikan bahwa flavonoid yang ditemukan dalam kakao dapat mencegah *early alcohol-induced liver injury* (McKim et al. 2002). Di Indonesia sendiri penelitian tentang khasiat kakao belum banyak dilakukan. Manfaat kakao sebagai hepatoprotektif juga belum banyak diteliti.

Parasetamol dipilih sebagai penginduksi kerusakan histologi hepar mencit karena parasetamol merupakan salah satu obat yang paling sering digunakan secara overdosis (Gunnell et al. 2000). Parasetamol, atau dikenal juga sebagai asetaminofen, digunakan secara luas sebagai analgesik dan antipiretik yang banyak ditemui di toko-toko obat maupun sebagai obat resep. Meskipun parasetamol relatif aman digunakan pada dosis terapi, overdosis dapat menyebabkan nekrosis sentrilobular dan tubulus proksimalis pada manusia dan hewan percobaan (Lucas et al. 2000).

Parasetamol diaktifkan oleh enzim sitokrom P450 menjadi bahan metabolit bernama *N-acetyl-p-benzoquinone imine* (NAPQI) yang reaktif, sehingga menekan glutathione hepar kemudian berikatan kovalen dengan protein. Ikatan kovalen tersebut berhubungan dengan toksisitas parasetamol yang mengakibatkan kerusakan hepar (James et al. 2003).

Berdasarkan hal tersebut maka penelitian ini dilakukan untuk membuktikan potensi ekstrak biji kakao dalam

mengurangi kerusakan sel hepar mencit akibat paparan parasetamol. Dengan demikian, tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak biji kakao dalam mengurangi kerusakan histologis sel hepar mencit (*Mus musculus*) akibat pemberian parasetamol.

## BAHAN DAN METODE

### Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

### Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan meliputi kandang mencit 4 buah, masing-masing untuk 10 ekor mencit, timbangan hewan, timbangan obat, alat bedah hewan percobaan (*scalpel*, pinset, gunting, jarum, meja lilin, sonde lambung, peralatan untuk pembuatan preparat histologi, mikroskop cahaya medan terang, gelas ukur, pengaduk, dan kamera digital. Sementara itu, bahan-bahan yang digunakan meliputi parasetamol, makanan hewan percobaan (*pellet*), akuades, bahan-bahan untuk pembuatan preparat histologi dengan pengecatan HE, dan ekstrak biji kakao.

### Jenis penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik. Pada penelitian ini diberikan perlakuan ekstrak biji kakao terhadap sampel yang telah ditentukan yaitu berupa hewan percobaan di laboratorium.

### Subjek penelitian

Populasi yang digunakan berupa mencit (*Mus musculus*) jantan dengan galur Swiss Webster berumur 2-3 bulan dan berat badan  $\pm 20$  gram. Jumlah sampel yang digunakan ditentukan berdasarkan rumus *Federer* (Purawisastra 2001) sebagai berikut:

$$\begin{aligned}(k-1)(n-1) &> 15 \\ (4-1)(n-1) &> 15 \\ 3(n-1) &> 15 \\ 3n &> 15+3 \\ n &> 6\end{aligned}$$

Keterangan:

K = Jumlah kelompok

N = Jumlah sampel dalam tiap kelompok

Pada penelitian ini, jumlah sampel untuk tiap kelompok ditentukan sebanyak 10 ekor mencit ( $n > 6$ ), dan terdapat 4 kelompok perlakuan, sehingga pada penelitian ini dibutuhkan 40 mencit dari populasi yang ada. Sampel didapatkan dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada (UGM), Yogyakarta.

### Teknik sampling

Teknik *sampling* yang digunakan adalah *purposive sampling* (Murti 2006).

### Desain penelitian

Rancangan penelitian ini adalah *The post-test only control group design* (Taufiqqurohman 2003) yang dibagi dalam 4 kelompok perlakuan berikut ini: (i) K (kontrol negatif) = Kelompok kontrol, tanpa diberi ekstrak biji kakao maupun parasetamol. Kelompok ini diberi akuades 0,2 mL/20 g BB mencit per hari selama 17 hari berturut-turut. (ii) P1 = Kelompok perlakuan I, diberi parasetamol tanpa diberi ekstrak biji kakao. Kelompok ini diberikan akuades secara per oral sebanyak 0,2 mL/20 g BB mencit per hari selama 17 hari berturut-turut dan pada hari ke-15, 16, dan 17 diberi parasetamol 0,1 mL/20 g BB mencit per hari. (iii) P2 = Kelompok perlakuan II, diberi parasetamol dan ekstrak biji kakao dosis I. Kelompok ini diberi perlakuan ekstrak biji kakao secara per oral pada dosis I yaitu 0,2 mL/20 g BB mencit per hari selama 17 hari berturut-turut, dimana pada hari ke-15, 16, dan 17 juga diberikan parasetamol dosis 0,1 mL/20 g BB mencit per hari 1 jam setelah pemberian ekstrak biji kakao. (iv) P3 = Kelompok perlakuan III, diberi parasetamol dan ekstrak biji kakao dosis II. Kelompok ini diberi perlakuan ekstrak biji kakao dosis II yaitu 0,4 mL/20 g BB mencit per hari selama 17 hari berturut-turut, dimana pada hari ke-15, 16, dan 17 juga diberikan parasetamol dosis 0,1 mL/20 g BB mencit per hari 1 jam setelah pemberian ekstrak biji kakao.

Selanjutnya, pada masing-masing kelompok perlakuan dilakukan pengamatan terhadap jumlah inti sel hati piknosis, karioreksis, dan kariolisis dari 100 sel di sentriolobuler hepar. Pengamatan jumlah inti sel hepar piknosis, karioreksis, dan kariolisis tersebut dilakukan pada hari ke-18.

### Cara kerja

#### *Dosis dan pengenceran ekstrak biji kakao*

Dosis ekstrak biji kakao yang diberikan ditentukan berdasar hasil konversi dari tikus ke mencit (Ngatidjan 1991) dengan menggunakan dosis pada penelitian sebelumnya yaitu sebesar 400 mg/kg BB/hari pada tikus (McKim et al. 2002). Dosis pemberian ekstrak biji kakao tersebut diberikan dalam dua dosis, yaitu dosis I = 0,2 mL/20 g BB mencit per hari dan dosis II = 0,4 mL/20 g BB mencit per hari. Masing-masing dosis yang disondakan tersebut adalah ekstrak biji kakao yang diencerkan dengan akuades menjadi volume 0,2 mL (untuk dosis I) dan 0,4 mL (untuk dosis II). Ekstrak biji kakao diberikan sehari sekali selama 17 hari berturut-turut pada kelompok perlakuan 2, sedangkan ekstrak biji kakao dosis II diberikan sehari sekali selama 17 hari berturut-turut pada kelompok perlakuan 3.

#### *Ekstrak biji kakao dosis I*

Penghitungan ekstrak biji kakao dosis I yaitu sebagai berikut:

$$\begin{aligned}&= \text{Nilai konversi} \times 400 \text{ mg/kg BB} \\ &= 0,14 \times 400 \text{ mg/kg BB} \\ &= 56 \text{ mg/kg BB} \\ &= 1,12 \text{ mg/20 g BB}\end{aligned}$$

Sementara itu, pengenceran ekstrak biji kakao yaitu 56 mg ekstrak biji kakao + akuades  $\rightarrow$  10 mL larutan ekstrak biji kakao. Dalam 1 mL larutan mengandung 5,6 mg

ekstrak biji kakao → 0,2 mL larutan mengandung 1,12 mg ekstrak biji kakao.

Ekstrak biji kakao yang disondekan adalah ekstrak biji kakao yang telah diencerkan. Ekstrak biji kakao yang disondekan pada satu ekor mencit dengan berat badan 20 gram = 0,2 mL per hari yang diberikan selama 17 hari berturut-turut.

#### *Ekstrak biji kakao dosis II*

Ekstrak biji kakao dosis II adalah dua kali dosis ekstrak biji kakao dosis I yaitu sebesar 2,24 mg per hari. Jadi, larutan ekstrak biji kakao yang disondekan pada satu ekor mencit (20 gram) = 0,4 mL per hari yang diberikan selama 17 hari berturut-turut.

Pemberian ekstrak biji kakao selama 17 hari berturut-turut dimaksudkan untuk meningkatkan kadar antioksidan, sehingga kerusakan hepar dapat dicegah ketika terpapar parasetamol dosis toksik. Menurut Engler et al. (2004), pemberian cokelat dengan kandungan flavonoid yang tinggi selama dua minggu dapat meningkatkan konsentrasi *epicatechin* dalam plasma. Di luar jadwal perlakuan, mencit diberi pakan *pellet* dan minum air PAM secara *ad libitum*.

#### *Dosis dan pengenceran parasetamol*

LD-50 untuk mencit secara per oral yang telah diketahui adalah 338 mg/kg BB atau 6,76 mg/20 g BB mencit (Alberta dan Canada 2006). Dosis parasetamol yang dapat menimbulkan efek kerusakan hepar berupa nekrosis sel hepar tanpa menyebabkan kematian mencit adalah dosis 3/4 LD-50 per hari (Sabrang 2008). Dosis yang digunakan adalah 338 mg/kg BB x 0,75 = 253,5 mg/kg BB = 5,07 mg/20 g BB mencit. Parasetamol 500 mg dilarutkan dalam akuades hingga 9,86 mL, sehingga dalam 0,1 mL larutan parasetamol mengandung 5,07 mg parasetamol.

Parasetamol diberikan selama 3 hari berturut-turut yaitu pada hari ke-15, 16, dan 17. Pemberian parasetamol dengan cara ini dimaksudkan untuk menimbulkan kerusakan pada sel hepar berupa nekrosis pada daerah sentrolobularis tanpa menimbulkan kematian pada mencit. Menurut Wilmana dan Gunawan (2007), pemberian parasetamol dosis tunggal sudah dapat menimbulkan kerusakan sel hepar berupa nekrosis pada daerah sentrolobularis dalam waktu 2 hari setelah pemberian parasetamol.

#### *Persiapan mencit*

Mencit diadaptasikan terlebih dahulu selama tujuh hari di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran UNS, Surakarta. Sesudah adaptasi, keesokan harinya dilakukan penimbangan untuk menentukan dosis dan diberikan perlakuan.

#### *Pengelompokan subjek perlakuan*

Percobaan mulai dilakukan pada minggu kedua. Subjek dikelompokkan menjadi empat kelompok secara random, dan masing-masing kelompok terdiri dari 10 mencit. Masing-masing kelompok diberi perlakuan parasetamol dan ekstrak biji kakao sesuai dengan dosis yang telah ditentukan sebelumnya. Sebelum pemberian parasetamol dan ekstrak biji kakao, mencit dipuasakan terlebih dahulu

±5 jam untuk mengosongkan lambung mencit. Pemberian parasetamol dilakukan ±1 jam setelah pemberian ekstrak biji kakao agar ekstrak biji kakao terabsorpsi terlebih dahulu.

#### *Pengukuran derajat kerusakan sel hepar*

Parameter yang digunakan dalam sistem penilaian derajat kerusakan sel hepar adalah piknosis, karioreksis, dan kariolisis. Ketiga parameter tersebut diduga merupakan proses yang tidak berkelanjutan atau masing-masing berdiri sendiri. Oleh karena itu, skor yang diberikan pada penelitian ini adalah 1 untuk masing-masing tipe kerusakan.

Pada hari ke-18 setelah perlakuan pertama diberikan, semua hewan percobaan dikorbkan dengan cara dislokasi vertebra servikalis, kemudian organ hepar diambil untuk selanjutnya dibuat preparat histologi dengan metode blok parafin dengan pengecatan HE. Pembuatan preparat dilakukan pada hari ke-18 agar efek perlakuan tampak nyata. Lobus hepar yang diambil adalah lobus kanan dan irisan untuk preparat diambil pada bagian tengah dari lobus tersebut, hal ini dilakukan untuk mendapatkan preparat yang seragam. Dari tiap lobus kanan hepar dibuat 3 irisan dengan tebal tiap irisan 3-8 µm. Jarak antar irisan satu dengan irisan yang lain kira-kira 25 irisan. Tiap hewan percobaan dibuat 3 preparat. Kemudian dari 3 preparat tersebut diambil satu preparat secara random. Dari masing-masing preparat diambil satu daerah di sentrolobuler yang terlihat kerusakannya paling berat. Dari satu zona tersebut didapatkan satu skor untuk tiap 100 sel sentrolobuler, sehingga didapatkan satu skor dari satu ekor hewan percobaan. Dalam percobaan ini digunakan 10 hewan percobaan dalam tiap kelompok, sehingga diperoleh 10 skor untuk tiap kelompok percobaan. Pengamatan preparat dilakukan dengan perbesaran 100 kali untuk mengamati seluruh lapang pandang, kemudian ditentukan daerah yang diamati pada sentrolobuler lobulus hepar dan dipilih satu daerah yang kerusakannya terlihat paling berat. Dari tiap zona sentrolobuler lobulus hepar tersebut diamati dengan pembesaran 400 kali kemudian ditentukan jumlah inti sel yang mengalami piknosis, karioreksis, dan kariolisis dari tiap 100 sel.

#### **Analisis data**

Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan uji *One-Way Analysis of Variant* (ANOVA). Jika terdapat perbedaan yang signifikan maka dilanjutkan dengan uji *Post-Hoc*. Derajat signifikansi yang digunakan adalah  $\alpha=0,05$  (Riwidikdo 2007).

Syarat dilakukan uji *One-Way ANOVA* adalah variabel data berupa variabel numerik/kontinu/rasio. Data pada penelitian ini adalah skor kerusakan histologis sel hepar mencit yang dinyatakan dengan angka rasio. Sebaran data harus normal, hal ini dibuktikan dengan nilai uji Kolmogorov-Smirnov atau Saphiro-Wilk yang memiliki nilai  $p$  lebih besar daripada nilai  $\alpha$ . Misalnya nilai  $\alpha=0,05$  maka nilai  $p$  untuk uji sebaran data harus  $>0,05$ . Varians data harus sama. Hal ini dapat diketahui dengan menggunakan uji *Homogeneity of Variances*, dimana untuk varians data yang sama akan memiliki nilai  $p >$  nilai  $\alpha$ . Jika

ketiga syarat tersebut tidak terpenuhi maka dapat digunakan uji hipotesis alternatif yaitu berupa uji hipotesis non-parametrik Kruskal-Wallis.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Hasil penelitian

Hasil rata-rata skor jumlah kerusakan sel hepar mencit yang diinduksi parasetamol pada masing-masing kelompok disajikan pada Tabel 1. Skor kerusakan yang paling tinggi adalah pada kelompok P1 yaitu  $60,300 \pm 10,698$  dan skor kerusakan paling rendah adalah pada kelompok kontrol (K) yaitu  $28,500 \pm 7,487$ .

Data yang diperoleh dari hasil penelitian, pertama kali diuji adanya perbedaan skor rata-rata kerusakan sel hepar mencit yang signifikan antara keempat kelompok dengan menggunakan uji *One-Way ANOVA*. Analisis data dilakukan dengan menggunakan program komputer *Statistical Product and Service Solution (SPSS) 17.0 for Windows*.

Metode analisis yang dapat digunakan untuk menentukan sebaran data termasuk normal atau tidak normal adalah uji Kolmogorov-Smirnov (sampel > 30) atau uji Saphiro-Wilk (sampel < 30). Pada penelitian ini digunakan 40 sampel sehingga digunakan uji Kolmogorov-Smirnov untuk menentukan sebaran data termasuk normal atau tidak.

Nilai p dari hasil uji Kolmogorov-Smirnov untuk kelompok kontrol, kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 berturut-turut yaitu 0,156; 0,200; 0,200; dan 0,200 dimana keempat nilai tersebut lebih besar dari  $\alpha=0,05$ . Dengan demikian dapat dikatakan bahwa sebaran data kelompok kontrol normal, sebaran data kelompok perlakuan 1 normal, sebaran data kelompok perlakuan 2 normal, dan sebaran data kelompok perlakuan 3 normal.

Syarat kedua untuk menggunakan uji *One-Way ANOVA* telah terpenuhi, selanjutnya dilakukan uji *Homogeneity of Variances* untuk mengetahui varians data tergolong sama atau tidak. Nilai p yang didapatkan dari uji *Homogeneity of Variances* adalah sebesar 0,670, dimana nilai tersebut lebih besar dari 0,05 dan dapat diartikan bahwa varians data antarkelompok sama. Syarat ketiga untuk menggunakan uji *One-Way ANOVA* telah terpenuhi, sehingga uji *One-Way ANOVA* dapat dilakukan.

Nilai p dari hasil uji *One-Way ANOVA* adalah sebesar 0,000 ( $p < 0,05$ ), sehingga terdapat perbedaan skor rata-rata kerusakan histologis sel hepar yang signifikan antara kelompok kontrol, kelompok perlakuan 1, kelompok perlakuan 2, dan kelompok perlakuan 3.

Oleh karena didapatkan adanya perbedaan yang signifikan dari empat kelompok tersebut maka uji statistik dilanjutkan dengan uji *Post-Hoc* untuk mengetahui kelompok-kelompok yang menunjukkan perbedaan rata-rata skor jumlah kerusakan histologis sel hepar. Adapun uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah uji LSD (Tabel 2).

**Tabel 1.** Rerata skor kerusakan sel hepar mencit yang diinduksi parasetamol pada masing-masing kelompok perlakuan

Kelompok	Rata-rata Skor	Standar Deviasi
K	28,500	7,487
P1	60,300	10,698
P2	38,000	6,667
P3	33,400	6,077

Keterangan: K = Kelompok kontrol, P1 = kelompok perlakuan 1, P2 = kelompok perlakuan 2, P3 = kelompok perlakuan 3

**Tabel 2.** Ringkasan hasil uji LSD ( $\alpha=0,05$ )

Kelompok	p	Signifikansi
K – P1	0,000	Signifikan
K – P2	0,014	Signifikan
K – P3	0,162	Tidak signifikan
P1 – P2	0,000	Signifikan
P1 – P3	0,000	Signifikan
P2 – P3	0,365	Tidak signifikan

Keterangan: K = Kelompok kontrol, P1 = kelompok perlakuan 1, P2 = kelompok perlakuan 2, P3 = kelompok perlakuan 3

### Pembahasan

Sel-sel hati berbentuk poligonal, dengan 6 permukaan atau lebih, dan mempunyai garis tengah kira-kira 20-30  $\mu\text{m}$ . Ukurannya bermacam-macam, inti besar, bulat, atau lonjong, dengan permukaan sel teratur, besarnya bervariasi antar satu sel dengan sel lainnya, vesicular atau kadang-kadang berinti dua, serta mempunyai sitoplasma granula asidofil. Pada potongan yang diwarnai dengan Hematoksilin dan Eosin, sitoplasma hepatosit bersifat eosinofilik terutama karena adanya mitokondria dalam jumlah besar dan sedikit retikulum endoplasma halus. Pada sel hati jarang ditemukan mitosis, tetapi banyak sel mitosis ditemukan selama penyembuhan setelah cedera (Fiore dan Mariano 1996; Junqueira dan Carneiro 1995; Lesson et al. 1996).

Sel hepar mencit yang terpapar parasetamol akan mengalami kerusakan yang digambarkan dengan terdapatnya inti sel yang mengalami piknotik, karioreksis, dan kariolisis. Adapun dengan pemberian parasetamol ditambah dengan ekstrak biji kakao, derajat kerusakan sel hepar yang didapatkan lebih sedikit dibandingkan dengan pemberian parasetamol tanpa ekstrak biji kakao, karena ekstrak biji kakao memiliki efek hepatoprotektif terhadap efek toksik yang disebabkan oleh pemberian parasetamol. Kelompok kontrol digunakan sebagai pembanding terhadap kelompok parasetamol dan kelompok perlakuan. Kelompok kontrol hanya diberikan akuades sebagai placebo dan diharapkan kerusakan sel hepar yang terjadi dapat seminimal mungkin, dimana derajat kerusakan pada kelompok kontrol dianggap sebagai derajat normal.

Dari uji *One-Way ANOVA* didapatkan perbedaan yang signifikan antara keempat kelompok perlakuan. Hasil uji LSD menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok K-P1, K-P2, P1-P2, dan P1-3, tetapi antara kelompok K-P3 dan P2-P3 menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan.

Hasil uji LSD menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan dari skor rata-rata kerusakan sel hepar pada kelompok kontrol dan P1. Hal ini terjadi karena kelompok P1 mengalami kerusakan sel hepar akibat pemberian parasetamol dosis toksik. Hasil tersebut sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa parasetamol dosis toksik mengakibatkan kerusakan sel hepar (Hardman dan Limbird 2008).

Kerusakan sel hepar disebabkan oleh metabolit antara parasetamol yang berikatan dengan protein sel. Metabolit antara tersebut dikenal dengan *quinoneimin* yang dibentuk oleh enzim P450. Pada dosis terapeutik parasetamol, *quinoneimin* yang terbentuk akan berkonjugasi dengan *glutathion*. Pada dosis yang lebih besar, *glutathion* yang tersedia akan semakin sedikit dan akhirnya habis. Akibatnya, *quinoneimin* akan berikatan dengan gugus sulfhidril (-SH) protein sel dan menyebabkan nekrosis sel hepar (Hodgson dan Levi 2000; Smith dan Reynard 1992). *Glutathion* berperan sebagai antioksidan. Sebagai antioksidan, tripeptida tersebut difasilitasi oleh gugus sulfhidril dari sistein (Winarsi 2007).

Pada kelompok kontrol didapatkan juga gambaran inti sel hepar yang mengalami piknosis, karioreksis, dan kariolisis. Hal ini diduga disebabkan oleh proses penuaan dan kematian sel secara fisiologis setiap 150 hari serta akibat pengaruh variabel luar yang tidak dapat dikendalikan (Gartner dan Hiatt 2007).

Dari hasil analisis skor kerusakan sel antara kelompok P1-P2 didapatkan perbedaan yang signifikan. Hal ini berarti pemberian ekstrak biji kakao dengan dosis I yaitu 1,12 mg/20 g BB mencit selama 14 hari berturut-turut dapat mengurangi jumlah inti sel hepar yang mengalami kerusakan akibat pemberian parasetamol. Menurut Kumar et al. (2005), hepatotoksitas dapat dikurangi dengan pemberian antioksidan. Kakao mengandung antioksidan dalam bentuk flavonoid. Flavonoid mampu menangkap radikal bebas (*free radical scavengers*) dengan melepaskan atom hidrogen dari gugus hidroksilnya (Keen 2001; Ide 2008). Melalui mekanisme antioksidan tersebut, ekstrak biji kakao dapat mencegah kerusakan histologis sel hepar.

Kelompok P2 merupakan kelompok perlakuan setelah pemberian ekstrak biji kakao dosis 1,12 mg/20 g BB mencit dan parasetamol. Hasil analisis kerusakan sel hepar pada kelompok P2 menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kelompok kontrol dan kelompok P1. Hal ini berarti pemberian ekstrak biji kakao dengan dosis 1,12 mg/20 g BB mencit dapat mengurangi kerusakan sel hepar mencit akibat pemberian parasetamol, tetapi tidak dapat mengembalikan sel hepar pada kondisi seperti pada kelompok kontrol.

Hasil kelompok P3 menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kelompok P1, namun menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan dengan kelompok kontrol. Hal ini berarti pemberian ekstrak biji kakao dengan dosis 2,24 mg/20 g BB dapat mengurangi kerusakan sel hepar mencit akibat pemberian parasetamol dan mempertahankan sel hepar pada kondisi seperti kelompok kontrol.

Derajat kerusakan sel hepar pada kelompok P2 lebih besar daripada kelompok P3, namun hasil uji LSD menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan. Hal ini

berarti peningkatan dosis ekstrak biji kakao dapat meningkatkan efek proteksi terhadap kerusakan sel hepar yang ditimbulkan oleh parasetamol, tetapi peningkatannya tidak signifikan. Menurut Bourne dan Roberts (1998), kurva hubungan antara dosis dan efek obat berbentuk sigmoid dengan suatu bagian tengah yang lurus atau linier. Dengan bertambahnya dosis obat, peningkatan respons berkurang, dan akhirnya dosis maksimal tercapai, dimana responsnya tidak dapat ditingkatkan lagi. Pengaruh ekstrak biji kakao terhadap kerusakan sel hepar yang diinduksi parasetamol dapat dianalogikan dengan cara kerja obat tersebut. Apabila dosis ekstrak biji kakao digambarkan dalam kurva hubungan antara dosis dan efek obat maka efek dosis I dan dosis II berada pada bagian kurva yang hampir lurus atau linier, sehingga peningkatan efeknya tidak terlalu signifikan.

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa terbukti adanya efek proteksi ekstrak biji kakao terhadap sel hepar berupa pengurangan jumlah kerusakan sel hepar mencit yang diinduksi parasetamol pada dosis I, yaitu sebesar 1,12 mg/20 g BB, meskipun belum optimal karena hasilnya belum sebanding dengan kelompok kontrol. Adapun pada dosis yang lebih besar, yaitu dosis II sebesar 2,24 mg/20 g BB, terbukti adanya peningkatan efek proteksi ekstrak biji kakao terhadap hepar meskipun perbedaannya tidak signifikan dibandingkan dengan dosis I dan hasilnya cukup optimal karena hasilnya sebanding dengan kelompok kontrol.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak biji kakao dapat mengurangi kerusakan histologis sel hepar mencit akibat pemberian parasetamol.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alberta G, Canada G. 2006. Drug bank: Acetaminophen (APRD00252). redpoll.pharmacy.ualberta.ca. [26 November 2009].
- Bourne HR, Roberts JW. 1998. Reseptor-reseptor obat dan farmakodinamik. In: Katzung BG. Farmakologi Dasar dan Klinik, Edisi VI. EGC, Jakarta.
- Engler MB, Engler MM, Chen CY et al. 2004. Flavonoid-rich dark chocolate improves endothelial function and increases plasma epicatechin concentration in healthy adults. *J Am Coll Nutr* 23: 197-204.
- Fiore, Mariano SH. 1996. Atlas histologi manusia. Edisi ke-6. EGC, Jakarta.
- Flammer AJ, Hermann F, Sudano I et al. 2007. Dark chocolate improves coronary vasomotion and reduces platelet reactivity. *Circulation* 116: 2376-2382.
- Gartner LP, Hiatt JL. 2007. Color textbook of histology. 3<sup>rd</sup> edition. Elsevier Inc., China.
- Gunnell D, Murray V, Hawton K. 2000. Use of paracetamol (acetaminophen) for suicide and nonfatal poisoning: Worldwide patterns of use and misuse. *Suicide Life Threat Behav* 30(4): 313-326.
- Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG. 2008. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 10<sup>th</sup> edition. McGraw-Hill Companies, New York.
- Hodgson E, Levi PE. 2000. A textbook of modern toxicology. McGraw-Hill Companies Inc., Singapore.
- Ide P. 2008. Dark chocolate healing. PT Elex Media Computindo, Jakarta.

- James LP, Mayeux PR., Hinson JA. 2003. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Clin Pharmacol Ther* 31: 1499-1506.
- Jenkins DJA, Kendall CWC, Vuksan V et al. 2000. Effect of cocoa bran on low-density lipoprotein oxidation and fecal bulking. *Arch Intern Med* 160: 2374-2379.
- Junqueira LC, Carneiro J. 1995. *Histologi dasar*. Edisi ke-3. EGC, Jakarta.
- Keen CL. 2001. Chocolate: Food as medicine/medicine as food. *J Am Coll Nutr* 20: 436-439.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N. 2005. *Pathologic Basis of Disease*. 7<sup>th</sup> ed. Elsevier Inc., China.
- Lamuela-Raventós RML, Pérez AIR., Lacueva CA et al. 2005. Health effects of cocoa flavonoids. *SAGE Journals* 11: 159.
- Leeson CR, Leeson TR, Paparo AA. 1996. *Buku teks histologi*. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Lucas AM, Hennig G, Dominick PK et al. 2000. Ribose cysteine protects against acetaminophen-induced hepatic and renal toxicity. *Toxicol Pathol* 28: 697-704.
- McKim SE, Konno A, Uesugi T et al. 2002. Cocoa extract protects against early alcohol-induced liver injury in the rat. *Arch Biochem Biophys* 406 (1): 40-46.
- Murti B. 2006. *Desain dan ukuran sampel untuk penelitian kuantitatif dan kualitatif di bidang kesehatan*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Ngatidjan. 1991. *Petunjuk laboratorium: Metode laboratorium dalam toksikologi*. Pusat Antar Universitas Bioteknologi UGM, Yogyakarta.
- Purawisastra S. 2001. Penelitian pengaruh isolat galaktomannan kelapa terhadap penurunan kadar kolesterol serum kelinci. [digilib.itb.ac.id](http://digilib.itb.ac.id). [26 November 2009].
- Rein D, Paglieroni TG, Wun T et al. 2000. Cocoa inhibits platelet activation and function. *Am J Clin Nutr* 72: 30-35.
- Riwidikdo H. 2007. *Statistik kesehatan, belajar mudah teknik analisis data dalam penelitian kesehatan*. Mitra Cendikia Press, Yogyakarta.
- Sabrang R. 2008. Pengaruh Minyak Jintan Hitam (*Nigella sativa*) terhadap Kerusakan Histologis Hepar Mencit (*Mus musculus*) yang Diinduksi Parasetamol. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Smith CM, Reynard AM. 1992. *Textbook of Pharmacology*. WB Saunders Company, Philadelphia.
- Taufiqurohman MA. 2003. *Metodologi Penelitian Kedokteran dan Kesehatan*. CSGF, Surakarta.
- Wilmana PF, Gunawan SG. 2007. Analgesik-antipiretik analgesik anti-inflamasi nonsteroid dan obat gangguan sendi lainnya. In: Gunawan SG (ed). *Farmakologi dan Terapi*. Edisi ke-5. Gaya Baru, Jakarta.
- Winarsi H. 2007. *Antioksidan alami dan radikal bebas*. Kanisius, Yogyakarta.