

Potensi Ekstrak Etanol Biji Kakao Terhadap Penghambatan *Firing* Tubul Nematosisista Racun *Physalia Utriculus* Secara *In Vitro*

Potential of Cocoa Ethanol Extract Toward Nematocyst Tubul Firing Inhibition of *Physalia Utriculus* Toxin *In Vitro*

Sarwendah Siswi Winasis¹, Al Munawir², Adelia Handoko³

¹Mahasiswa, Fakultas Kedokteran, Universitas Jember

²Departemen Patologi Anatomi dan Biomolekuler, Fakultas Kedokteran, Universitas Jember

³Departemen Fisiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Jember

e-mail korespondensi: almunawir.fk@unej.ac.id

Abstrak

Diperkirakan 150 juta kasus envenomasi akibat sengatan ubur-ubur terjadi setiap tahun secara global. Terdapat 100 dari 10.000 spesies ubur-ubur di dunia diketahui berbahaya bagi manusia yang salah satunya adalah *Physalia utriculus*. Tujuan penelitian ini ialah mengetahui potensi ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap penghambatan *firing* tubul nematosisista racun ubur-ubur (*P. utriculus*) secara *in vitro*. Metode yang digunakan ialah *true experimental design* dengan *post test only control group design*. Penelitian terdiri atas 8 kelompok: 1 kontrol normal, 1 kontrol positif, 1 kontrol negatif, dan 5 perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol biji kakao berkonsentrasi 20%, 2%, 0,2%, 0,02%, 0,002%. Pengamatan dilakukan dengan menghitung persentase jumlah nematosisista yang mengalami *firing*. Hasil penelitian didapatkan rata-rata persentase *firing* pada kelompok kontrol normal sebesar $42,50 \pm 3,18$, kelompok kontrol positif sebesar $37,97 \pm 5,57$, kelompok kontrol negatif sebesar $52,44 \pm 2,98$, dan kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol biji kakao 20%, 2%, 0,2%, 0,02%, 0,002% berturut-turut, yaitu $48,24 \pm 5,37$; $40,62 \pm 7,10$; $29,45 \pm 5,39$; $37,60 \pm 9,78$; $41,11 \pm 3,92$. Hasil uji statistik *One Way Anova* menunjukkan nilai signifikansi 0,001 ($p \leq 0,05$). Kesimpulan dari penelitian ini ialah ekstrak etanol biji kakao dengan konsentrasi 0,2% paling berpotensi menghambat *firing* tubul nematosisista racun ubur-ubur (*P. utriculus*) secara *in vitro*.

Kata kunci: *Physalia utriculus*, kakao, racun, ubur-ubur

Abstract

There was estimated 150 million envenomation cases due to jellyfish stings occur globally every year. 100 from 10,000 jellyfish species in the world known to be dangerous, one them is *Physalia utriculus*. The aim of this study was to determine the potential of cocoa (*Theobroma cacao* L.) ethanol extract toward nematocyst tubul firing inhibition of jellyfish (*Physalia utriculus*) toxin *in vitro*. The method was *true experimental design* with *post test only control group design*. The study divided into 8 groups: 1 normal control, 1 positive control, 1 negative control, and 5 treatments groups by giving cocoa ethanol extract with concentration 20%, 2%, 0.2%, 0.02%, 0.002%. The observation was made by calculating the percentage number of firing nematocysts. The result showed average percentage of firing nematocyst in the normal control group was 42.50 ± 3.18 , positive control group was 37.97 ± 5.57 , negative control group was 52.44 ± 2.98 , and treatment group which given with cocoa ethanol extract 20%, 2%, 0.2%, 0.02%, 0.002% were 48.24 ± 5.37 ; 40.62 ± 7.10 ; 29.45 ± 5.39 ; 37.60 ± 9.78 ; 41.11 ± 3.92 , respectively. The *One Way Anova* statistical results test show significance value 0.001 ($p \leq 0.05$). The conclusion of this study was the cocoa ethanol extract with concentration 0.2% has most potential to inhibit the jellyfish (*P. utriculus*) nematocyst tubule firing *in vitro*.

Keywords: *Physalia utriculus*, cocoa, toxin, jellyfish

Pendahuluan

Terdapat 100 dari 10.000 spesies ubur-ubur di dunia diketahui berbahaya bagi manusia (Cegolon *et al.*, 2013; Duarte *et al.*, 2014). Diperkirakan 150 juta kasus envenomasi akibat sengatan ubur-ubur terjadi setiap tahun secara global. Di Indonesia khususnya, selama kurun waktu 2005 hingga 2009 didapati laporan sebanyak 13 kasus envenomasi ubur-ubur, 7 diantaranya diakibatkan oleh *Physalia utriculus* (*Bluebottle*) yang setiap kasusnya telah mengenai puluhan hingga ratusan korban. Tercatat tahun 2008, terdapat 2 korban jiwa di Kabupaten Situbondo, Jawa Timur dan 1 korban jiwa berlokasi di Kecamatan Jebus, Kepulauan Bangka Belitung (Mujiono, 2010). Envenomasi ubur-ubur terjadi akibat proses *firing* tubul nematosista.

Firing tubul berfungsi untuk melumpuhkan mangsa dan sebagai mekanisme pertahanan diri. Kendati *firing* tubul nematosista merupakan reaksi fisiologis yang menguntungkan bagi ubur-ubur, sengatan yang diakibatkan menjadi suatu permasalahan penting dalam bidang toksikologi karena merugikan manusia. *Firing* tubul spesies *Physalia utriculus* perlu diwaspadai karena dapat menembus lapisan integumen hanya dalam waktu 3 mili detik sehingga menyebabkan gangguan sistemik secara cepat dan tiba-tiba dengan berbagai tingkat keparahan berupa rasa gatal, hemolisis, sitolisis, neurotoksik, kardiotoxik, bahkan hingga berefek letal (Slaughter *et al.*, 2009; Kitatani *et al.*, 2015; Calton *et al.*, 1978; Hessinger dan Lenhoff, 1988; Alam dan Qasim, 1991; Tibballs *et al.*, 2011). Pelbagai cara penanggulangan telah dilakukan sedari onset pertama sengatan dengan harapan dapat menyelamatkan kehidupan dan mencegah suatu keparahan melalui pemberian asam asetat (cuka), etanol, natrium bikarbonat, aluminium sulfat, air hangat, air dingin, air laut, bahkan urin (Giordano *et al.*, 2005; Loten *et al.*, 2006; Yoshimoto dan Yanagihara, 2002; Wilcox dan Yanagihara, 2016; Bais *et al.*, 2017; Remigante *et al.*, 2018).

Dekade ini penelitian obat berbasis bahan herbal kian dikembangkan. Salah satu tumbuhan yang dikenal dan terbukti memiliki banyak khasiat di bidang kesehatan ialah kakao (*Theobroma cacao* L.). Kakao, terutama bijinya, memiliki persentase kandungan fitokimia yang melimpah apabila dibandingkan dengan komponen lainnya (Belitz dan Grosch, 1999). Meskipun memiliki banyak kandungan fitokimia, hanya senyawa polifenol (*procyanidins*, *(-)-epicatechin*, dan *catechins*,

mineral (Ca^{2+} , Zn, dan Co), dan asam organik (asam asetat, asam sitrat, dan asam oksalat) yang terbukti dapat memengaruhi mekanisme *firing* (Lubbock *et al.*, 1981; Lubbock dan Amos, 1981; Salleo *et al.*, 1996; Novak *et al.*, 1993; Morabito *et al.*, 2014).

Pemanfaatan ekstrak etanol biji kakao berpotensi untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai pengobatan lini pertama sengatan ubur-ubur. Tata laksana dengan pemberian obat alternatif ekstrak etanol biji kakao diharapkan dapat menjaga integritas sel nematosista supaya racun tidak mengalami eksositoses. Belum ada penelitian maupun jurnal yang membahas pemanfaatan ekstrak tersebut sebagai inhibitor *firing* tubul nematosista. Oleh sebab itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi ekstrak etanol biji kakao (*T. cacao* L.) terhadap penghambatan *firing* tubul nematosista racun *Physalia utriculus* secara *in vitro*.

Metode Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan ialah *true experimental design* dan rancangan penelitian yang digunakan ialah *post test only control group design*. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia Fakultas Teknologi Hasil Pangan Politeknik Negeri Jember dan Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Jember pada bulan Januari 2019. Subjek yang digunakan oleh peneliti berupa racun ubur-ubur (*Physalia utriculus*) yang disimpan dalam bentuk kristal kemudian dilarutkan dengan ringer laktat hingga didapati konsentrasi 100 mg/ml. Pada penelitian ini secara keseluruhan terdapat 32 sampel yang dibagi menjadi 8 kelompok, yaitu kelompok kontrol normal (N) dengan air laut, kelompok kontrol positif (K+) dengan asam asetat 5%, kelompok kontrol negatif (K-) dengan isopropanolol, dan 5 kelompok perlakuan (P) dengan pemberian ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) berturut-turut konsentrasi 20%; 2%; 0,2%; 0,02%; 0,002%. Penelitian ini telah mendapat persetujuan uji kelayakan etik dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

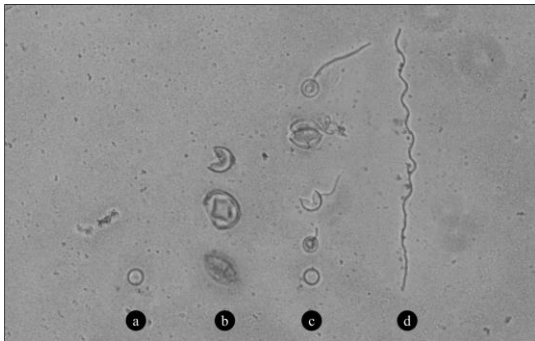
Variabel bebas dalam penelitian ini ialah konsentrasi ekstrak etanol biji kakao (*T. cacao* L.) yang terdiri atas 5 konsentrasi, yaitu 20%, 2%, 0,2%, 0,02%, dan 0,002%. Variabel terikat dalam penelitian ini ialah jumlah nematosista yang mengalami *firing*.

Penelitian dilakukan dengan menghomogenisasi setiap sampel menggunakan vortex selama 10 detik. Seluruh sampel dikondisikan dalam suhu ruang.

Setelah homogen, sampel diteteskan pada *object glass* kemudian ditutup *cover slide* 18x18 mm². Pada pengamatan ini menggunakan lapang pandang seluas 9x18 mm² dari total luas *cover slide*. Sampel diamati menggunakan mikroskop cahaya (Olympus CKX31, perbesaran 200x) yang dilengkapi kamera digital (AmScope MU500-HS) pada bagian lensa okulernya. Jumlah nematosista yang mengalami *firing* dihitung dengan memasukkan gambar yang telah dikalibrasi pada aplikasi AmScope (Kitatani *et al.*, 2015; Jouiaei *et al.*, 2015; Yanagihara *et al.*, 2016). Teknik pengumpulan data dilakukan secara eksperimental laboratoris. Nilai rata-rata diperoleh dari hasil penghitungan persentase jumlah *firing* tubul nematosista racun *Physalia utriculus* yang berkonsentrasi 100 mg/ml.

Hasil Penelitian

Macam-macam gambaran mikroskopik nematosista intak maupun nematosista yang mengalami *firing* pasca diberi perlakuan dapat diamati pada Gambar 1. Hasil penghitungan jumlah *firing* tubul nematosista pada masing-masing kelompok dapat dilihat pada Tabel 1 dan Gambar 2.



(a) dan (b) adalah nematosista intak sedangkan (c) dan (d) adalah nematosista yang mengalami *firing* tubul.

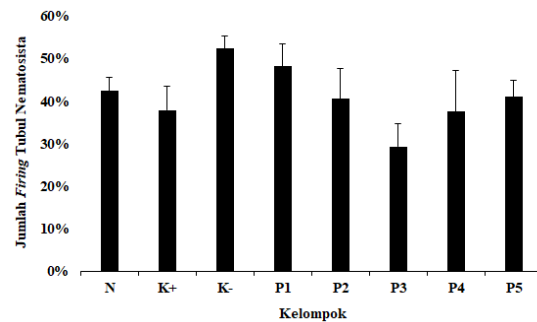
Gambar 1. Macam-macam penampakan nematosista intak dan nematosista yang mengalami *firing* tubul

Uji normalitas dan uji homogenitas menunjukkan nilai signifikan ($p > 0,05$) yang menunjukkan bahwa data penelitian terdistribusi normal dan memiliki varian sama. Uji *One Way ANOVA* menunjukkan nilai signifikan 0,001 ($p < 0,05$) yang berarti bahwa terdapat perbedaan jumlah *firing* tubul nematosista

secara bermakna pada masing-masing kelompok. Pada uji *Post Hoc Bonferroni* menunjukkan nilai signifikan 0,000 ($p < 0,05$) antara kelompok kakao 0,2% (P3) dengan kelompok isopropanolol (K-) dan juga antara kelompok asam asetat 5% (K+) dengan kelompok isopropanolol (K-) yang menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0,048 ($p < 0,05$).

Tabel 1. Rata-rata dan standar deviasi jumlah *firing* tubul nematosista setiap kelompok (%)

No.	Kelompok	Rata-rata ± Standar Deviasi (%)
1.	Normal	42,50 ± 3,18
2.	K Positif	37,97 ± 5,57
3.	K Negatif	52,44 ± 2,98
4.	Kakao 20%	48,24 ± 5,37
5.	Kakao 2%	40,62 ± 7,10
6.	Kakao 0,2%	29,45 ± 5,39
7.	Kakao 0,02%	37,60 ± 9,78
8.	Kakao 0,002%	41,11 ± 3,92



Gambar 2. Grafik hasil rata-rata dan standar deviasi jumlah *firing* tubul nematosista setiap kelompok (%)

Pembahasan

Asam asetat 5% atau cuka telah digunakan sebagai standar pertolongan pertama pada kasus sengatan ubur-ubur selama kurun waktu 40 tahun (Yanagihara *et al.*, 2016). Hasil penelitian menunjukkan bahwa asam asetat 5% maupun ekstrak kakao memiliki pengaruh yang signifikan terhadap penghambatan *firing* tubul nematosista racun ubur-ubur (*Physalia utriculus*) secara *in vitro*. Berdasar hasil analisis statistik kelompok P3 (kakao 0,2%) memiliki nilai rata-rata *firing* tubul nematosista lebih rendah dari pada kelompok kontrol positif (asam asetat 5%).

Kandungan fitokimia dalam biji kakao dan terbukti dapat memengaruhi mekanisme *firing* tubul, yaitu polifenol (*procyanidins*, *(-)-epicatechin*, *catechins*), mineral (Ca^{2+} , Zn, Co), dan asam organik (asam asetat, asam sitrat, asam oksalat) (Lubbock dan Amos, 1981; Salleo *et al.*, 1996; Novak *et al.*, 1993; Morabito *et al.*, 2014).

Kakao yang dimanfaatkan dalam bentuk ekstrak etanol biji kakao dan diaplikasikan sebagai terapi kuratif sengatan ubur-ubur dapat menghambat *firing* oleh karena memiliki efek antioksidan dan sitoproteksi (Andujar *et al.*, 2012; Oteiza *et al.*, 2005; Engel *et al.*, 2002). Efek antioksidan yang ditimbulkan oleh senyawa polifenol bekerja dengan menurunkan produksi nitrit oksida (NO) sehingga menyebabkan semakin sedikit NO yang berikatan dengan reseptor silia atau cnidosit di permukaan membran nematosista. Senyawa polifenol dalam ekstrak etanol biji kakao juga dapat berikatan dengan *nematocyst outer wall antigen* (NOWA) (materi penyusun dinding luar) sehingga memberikan efek sitoproteksi terhadap nematosista dari stimulus luar yang bersifat destruktif (Tarahovsky *et al.*, 2008; Oteiza *et al.*, 2005; Engel *et al.*, 2002). Penghambatan *firing* tubul nematosista juga dapat ditimbulkan oleh komponen mineral serta keadaan pH asam oleh karena komponen asam organik dalam ekstrak kakao tersebut. Mineral dan asam organik bekerja dengan cara menggeblok dan mengganggu sistem transpor kanal ion membran nematosista. Keadaan asam juga mengakibatkan nematosista mengalami kolaps sehingga mengurangi kemampuan *firing*nya (Morabito *et al.*, 2014).

Kesimpulan

Kesimpulan penelitian ini adalah pemberian ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan konsentrasi 0,2% paling berpotensi menghambat *firing* tubul nematosista racun ubur-ubur (*Physalia utriculus*) secara *in vitro*.

Daftar Pustaka

Alam JM dan Qasim R. 1991. *Toxicology of Physalia's (Portugese man-o'war) Venom*. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences. 4(2): 159–168.

Andujar I, et al. 2012. *Cocoa Polyphenols and Their Potential Benefits for Human Health*.

Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2012: 1–23.

Bais DS, et al. 2017. *Envenomation with Skin Manifestations and Treatments*. Toxicol Open Access. 3(3): 132.

Belitz HD dan Grosch W. 1999. *Food Chemistry*. Edisi 2. New York: Springer.

Calton GJ, Burnett JW, dan Vader W. 1978. *A Study of the Nematocyst Venoms of the Sea Anemone, Bolocera Tuediae*. Toxicon. 16(5): 443–451.

Cegolon L, et al. 2013. *Jellyfish Stings and Their Management: A Review*. Marine Drugs. 11(12): 523–550.

Duarte CM, Pitt KA, dan Lucas CH. 2014. *Introduction: Understanding Jellyfish Blooms. Dalam Jellyfish Blooms*. Edisi 1. Editor K. Pitt dan Lucas C. Dordrecht: Springer.

Engel U, et al. Holstein. 2002. *NOWA, a Novel Protein with Minicollagen Cys-Rich Domains, is Involved in Nematocyst Formation in Hydra*. Journal of Cell Science. 115: 3923–3934.

Giordano AR, Vito L, dan Sardella PJ. 2005. *Complication of a Portuguese Man-of-War Envenomation to the Foot: A Case Report*. The Journal of Foot and Ankle Surgery. 44(4): 297–300.

Hessinger DA dan Lenhoff HM. 1988. *The Biology of Nematocysts*. Edisi 1. Philadelphia: Elsevier.

Jouiaei M, et al. 2015. *Firing the Sting: Chemically Induced Discharge of Cnidaria Reveals Novel Proteins and Peptides from Box Jellyfish (Chironex fleckeri) Venom*. Toxins. 7(3): 936–950.

Kim J, et al. 2014. *Cocoa Phytochemicals: Recent Advances in Molecular Mechanisms on Health*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 54(11): 1458–1472.

Kitatani R, et al. 2015. *Length is Associated with Pain: Jellyfish with Painful Sting Have Longer Nematocyst Tubules than Harmless Jellyfish*. PLOS ONE. 10(8): e0135015.

Loten C, et al. 2006. *A Randomised Controlled Trial of Hot Water (45 Degrees C^o) Immersion Versus Ice Packs for Pain Relief in Bluebottle Stings*. Med J Aust. 184(7): 329–33.

- Lubbock R, Gupra BL, dan Hall TA. 1981. *Novel Role of Calcium in Exocytosis: Mechanism of Nematocyst Discharge as Shown by X-Ray Microanalysis*. *Cell Biology*. 78(6): 3624–3628.
- Lubbock R dan Amos WB. 1981. *Removal of Bound Calcium from Nematocyst Contents Causes Discharge*. *Nature*. 290: 500–501.
- Morabito R, et al. 2014. *Heavy Metals Affect Nematocysts Discharge Response and Biological Activity of Crude Venom in the Jellyfish Pelagia noctiluca (Cnidaria, Scyphozoa)*. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 34(2): 244–254.
- Mujiono N. 2010. *Jellyfish Sting: An Indonesian Case Report*. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. 2(1): 1–9.
- Novak I, et al. 1993. *Advances in Comparative and Environmental Physiology: Mechanics of Nematocyst Discharge*. Edisi 15. Springer. 165: 45–76.
- Oteiza PI, et al. 2005. *Flavonoid-Membrane Interactions: A Protective Role of Flavonoids at the Membrane Surface?* *Clinical & Developmental Immunology*. 12(1): 19–25.
- Remigante A, et al. 2018. *Impact of Scyphozoan Venoms on Human Health and Current First Aid Options for Stings*. *Toxins*. 10(4): 133.
- Salleo A, et al. 1996. *The Discharge Mechanism of Acontial Nematocytes Involves the Release of Nitric Oxide*. *The Journal of Experimental Biology*. 199: 1261–1267.
- Slaughter RJ, et al. 2009. *New Zealand's Venomous Creatures*. *The New Zealand Medical Journal*. 122(1290): 83–97.
- Tarahovsky YS. 2008. *Plant Polyphenols in Cell-Cell Interaction and Communication*. *Plant Signaling & Behavior*. 3(8): 609–611.
- Tibballs J, et al. 2011. *Immunological and Toxicological Responses to Jellyfish Stings*. *Inflammation & Allergy-Drug Targets*. 10: 438–446.
- Wilcox CL dan Yanagihara AA. 2016. *Heated Debates: Hot-Water Immersion or Ice Packs as First Aid for Cnidarian Envenomations?* *Toxins (Basel)*. 8(4): 97.
- Yanagihara AA, et al. 2016. *Experimental Assays to Assess the Efficacy of Vinegar and Other Topical First-Aid Approaches on Cubozoan (Alatina alata) Tentacle Firing and Venom Toxicity*. *Toxins*. 8(1): 1–21.
- Yoshimoto CM dan Yanagihara AA. 2002. *Cnidarian (Coelenterate) Envenomations in Hawai'i Improve Following Heat Application*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 96(3): 300–3.