

Research Report

Sitotoksitas Ekstrak Kulit Kakao (*Theobroma cacao*) terhadap Kultur Sel Fibroblas *BHK-21*

Fajariana Fitriani¹, Agus Subiwahjudi², Adioro Soetojo², Tamara Yuanita²

¹Undergraduate Student of Dental Medicine Faculty, Airlangga University, Surabaya – Indonesia

²Staff Department of Conservative Dentistry, Dental Medicine Faculty, Airlangga University, Surabaya – Indonesia

ABSTRAK

Latar Belakang: Irigasi saluran akar merupakan salah satu tahapan penting untuk menunjang keberhasilan perawatan. Sodium hipoklorit (NaOCl) merupakan larutan irigasi utama yang sering digunakan namun memiliki sejumlah kekurangan yakni bersifat toksik jika diirigasi sampai ke jaringan periradikular. Kakao (*Theobroma cacao*) merupakan tumbuhan suku *Sterculiaceae* yang kulit buahnya mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin dan terpenoid. Senyawa-senyawa tersebut terbukti dapat menghambat pembentukan biofilm pada bakteri *Enterococcus faecalis* yang merupakan bakteri paling resisten pada saluran akar. Ekstrak kulit kakao diharapkan dapat menjadi bahan alternatif irigasi saluran akar yang ideal, sehingga perlu dilakukan penelitian mengenai efek sitotoksitasnya terhadap jaringan. **Tujuan:** Menentukan konsentrasi dari ekstrak kulit kakao yang memberikan efek sitotoksik pada sel fibroblas *BHK-21*. **Metode:** Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimental laboratoris dengan menggunakan kultur sel fibroblas *BHK-21*. Ekstrak kulit kakao diperoleh melalui maserasi menggunakan etanol 70% dan dilakukan pengenceran dengan konsentrasi 1,56%, 3,125%, 6,125%, 12,5%, 25%, 50%, dan 100%. Sel *BHK-21* dalam *microplate 96 well* dipaparkan dengan ekstrak kulit kakao. Uji sitotoksitas menggunakan *MTT assay* dan absorbansi warna dibaca menggunakan *Elisa reader*. Nilai absorbansi dihitung dengan rumus sehingga didapatkan hasil akhir berupa persentase kematian sel. **Hasil:** Peningkatan konsentrasi ekstrak kulit kakao berbanding lurus dengan kenaikan persentase sel fibroblas *BHK-21* yang mati. **Kesimpulan:** Konsentrasi minimum ekstrak kulit kakao yang dapat memberikan efek sitotoksik pada sel fibroblas *BHK-21* adalah 6,25%.

Kata kunci: ekstrak kulit kakao, sitotoksitas, *MTT assay*, sel fibroblas *BHK-21*

Correspondence: Tamara Yuanita, Staff Department of Conservative Dentistry, Dental Medicine Faculty, Airlangga University, Surabaya – Indonesia, +628155130747. tamara-y@fkg.unair.ac.id

LATAR BELAKANG

Perawatan saluran akar merupakan salah satu tindakan dari perawatan endodontik yang bertujuan untuk mengeliminasi serta mencegah bakteri agar tidak masuk lebih dalam ke sistem saluran akar¹. Perawatan saluran akar memiliki tiga prinsip dasar yang dikenal sebagai “*Triad Endodontic*” terdiri atas preparasi biomekanik, irigasi dan disinfeksi, serta obturasi. Keseluruhan dari aspek tersebut merupakan suatu kesatuan yang harus

dilakukan dengan benar dan apabila terdapat satu tahapan yang salah, maka dapat menggagalkan seluruh sistem perawatan. Tindakan preparasi harus dilakukan dalam keadaan steril untuk mengurangi terjadinya kegagalan perawatan².

Irigasi saluran akar merupakan salah satu tahapan penting untuk menunjang keberhasilan perawatan karena berfungsi untuk menghilangkan debris, membantu menghilangkan *smear layer*, menetralkan

flora normal, dan sebagai pelarut jaringan serta pelumas³. Salah larutan irigasi yang paling sering digunakan dalam bidang kedokteran gigi adalah sodium hipoklorit (NaOCl), yang berfungsi untuk membersihkan dan mendisinfeksi saluran akar⁴.

Konsentrasi sodium hipoklorit yang digunakan pada terapi endodontik berkisar antara 0,5% sampai 5,25%. Mekanisme kerja dari sodium hipoklorit adalah dengan melarutkan jaringan vital dan nekrotik untuk kemudian merusak protein dan mengubahnya menjadi asam amino. Sodium hipoklorit telah digunakan secara luas, namun memiliki sejumlah kekurangan, yakni bersifat toksik jika diirigasi sampai ke jaringan periradikular, sehingga menyebabkan rasa sakit, perdarahan, serta pembengkakan atau oedema yang luas⁵. Pada anak-anak, penggunaan sodium hipoklorit sebagai saluran irigasi dapat menyebabkan terjadinya kerusakan pada folikel gigi permanen, jaringan perifer, dan mukosa rongga mulut⁶. Hal tersebut membuat peneliti terus melakukan pengembangan mengenai larutan irigasi alternatif berbahan dasar alami sebagai pengganti sodium hipoklorit. Salah satu bahan dasar alami yang dapat dimanfaatkan adalah tanaman kakao.

Kakao atau koka (*Theobroma cacao*) merupakan satu-satunya dari 22 jenis marga *Theobroma*, suku *Sterculiaceae* yang

dusahakan secara komersial⁷. Terbagi dalam tiga kelompok besar, yaitu Criollo, Forastero dan Trinitario. Dalam tata niaga, kakao Criollo termasuk dalam kelompok kakao mulia (*fine flavor cocoa*). Sedangkan kakao Forastero merupakan kelompok kakao lindak (*bulk cocoa*) yang mendominasi hampir 95% produksi kakao dunia⁸.

Berdasarkan penelitian Rachmawaty *et al.*, (2017) melalui analisis fitokimia menggunakan pelarut etanol dan aseton, diketahui bahwa ekstrak kulit buah kakao mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, tanin dan saponin⁹. Sedangkan penelitian milik Loppies & Yumnas (2014) menunjukkan bahwa ekstrak kulit kakao yang dilarutkan dalam etanol dan diuji secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT) mengandung senyawa terpenoid, polifenol atau tanin dan flavonoid¹⁰. Semua senyawa aktif tersebut merupakan antimikroba nabati yang memiliki potensi besar untuk melawan bakteri, jamur, protozoa, dan virus¹¹.

Yuanita *et al.*, (2017) dalam penelitiannya menggunakan ekstrak kulit buah kakao yang diencerkan secara bertingkat dari konsentrasi 100% hingga 0,19% menyatakan bahwa ekstrak kulit kakao memiliki kemampuan untuk menghambat pembentukan biofilm pada bakteri *Enterococcus faecalis* yang merupakan bakteri paling resisten pada saluran akar. Konsentrasi hambat minimal biofilm berada pada konsentrasi 3,12%¹².

Ekstrak kulit buah kakao yang telah terbukti memiliki aktivitas antibakteri dan

antifungi diharapkan bisa menjadi alternatif bahan irigasi saluran akar yang ideal. Oleh karena itu, diperlukan suatu uji sitotoksitas untuk melihat seberapa besar efek toksik dari bahan tersebut.

Uji sitotoksitas merupakan bagian awal dari evaluasi suatu bahan kedokteran gigi sebelum digunakan pada manusia¹³. Media uji yang paling banyak digunakan adalah sel fibroblas *Baby Hamster Kidney-21 (BHK-21)*. Kultur ini banyak digunakan karena memiliki sifat stabil, tidak mengalami mutasi, mudah tumbuh, dan mudah dikultur. Sedangkan metode yang paling sering digunakan adalah dengan metode *Microculture Tetrazolium Technique Assay (MTT Assay)* karena dapat digunakan untuk mengukur sampel dalam jumlah besar, waktu relatif cepat, sensitif, dan akurat¹⁴.

Dasar uji enzimatik *MTT* yaitu dengan melakukan pengukuran terhadap kemampuan sel hidup berdasarkan aktivitas mitokondrianya. Sel yang masih hidup dan metabolismenya aktif, dapat mengubah *MTT* menjadi produk formazan berwarna ungu. Sedangkan sel yang mati akan kehilangan kemampuan untuk mengubah *MTT* menjadi formazan¹⁵.

Hingga saat ini belum ada penelitian lebih lanjut mengenai sitotoksitas ekstrak kulit kakao (*Theobroma cacao*) terhadap sel fibroblas *BHK-21*, sehingga perlu dilakukan penelitian mengenai

sitotoksitas untuk mengetahui efek toksik ekstrak kulit kakao pada sel fibroblas *BHK-21*.

BAHAN DAN METODE

a. Pembuatan Ekstrak Kulit Kakao¹⁶

Satu kilogram kulit kakao jenis *Forastero* yang berasal dari PT. Perkebunan Nusantara XII-Kebun Kaliklatak Banyuwangi dibersihkan, kemudian dipotong tipis dengan ketebalan sekitar 1-2 mm, selanjutnya dikeringkan di udara terbuka selama tiga hari. Kulit kakao yang telah kering digiling hingga menjadi serbuk. Sebanyak 40 gram serbuk kulit kakao dimaserasi dengan menggunakan pelarut dengan cara direndam pada 400 ml etanol 70% dalam *shaker* (Shreeji, India) dengan kecepatan 120 rpm secara kontinyu selama 24 jam. Hasil larutan disaring dengan menggunakan kertas saring Whatmann no.41, (GE Healthcare Life Science, USA) sehingga diperoleh maserat. Pelarut (etanol) dalam maserat diuapkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* (Shreeji, India) sampai diperoleh ekstrak dengan bobot konstan.

b. Pengenceran Ekstrak Kulit Kakao¹⁷

Pengenceran ekstrak kulit kakao dilakukan di Pusat Veteriner Farma Surabaya (PUSVETMA). Ekstrak kulit kakao diencerkan dalam berbagai konsentrasi dengan menggunakan media *Eagles* (Gibco, USA). - Kosentrasi 50% didapatkan dengan mengencerkan 0,50 ml ekstrak kulit kakao

100% dan ditambahkan dengan 0,50 ml media *Eagles*.

- Kosentrasi 25% didapatkan dengan mengencerkan 0,25 ml ekstrak kulit kakao 100% dan ditambahkan dengan 0,75 ml media *Eagles*.

- Kosentrasi 12,5% didapatkan dengan mengencerkan 0,125 ml ekstrak kulit kakao 100% dan ditambahkan dengan 0,875 ml media *Eagles*.

- Kosentrasi 6,25% didapatkan dengan mengencerkan 0,0625 ml ekstrak kulit kakao 100% dan ditambahkan dengan 0,9375 ml media *Eagles*.

- Kosentrasi 3,125% didapatkan dengan mengencerkan 0,03125 ml ekstrak kulit kakao 100% dan ditambahkan dengan 0,96875 ml media *Eagles*.

- Kosentrasi 1,56% didapatkan dengan mengencerkan 0,0156 ml ekstrak kulit kakao 100% dan ditambahkan dengan 0,9844 ml media *Eagles*.

c. *Persiapan Kultur Sel Fibroblas BHK-21*^{18,19}

Kultur sel induk (*seed cells*) yang sebelumnya telah dibekukan, dicairkan dalam akuades steril suhu 37°C. Kemudian diputar dengan centrifuge 1500 rpm selama 15 menit. Di dalam *laminar flow* (Clemco, Australia), supernatan yang ada dibuang sehingga tersisa endapan sel di dasar. Endapan sel tersebut kemudian diambil dan disuspensikan dengan media

Eagles dan *Fetal Bovine Serum* 10% (SERANA®, Jerman). Media *Eagles* sebanyak 36 ml ditambahkan ke dalam botol *Roux* (Duran®, Jerman) yang berisi serum 4 ml. Endapan sel yang telah disuspensikan, ditanam dalam botol *Roux* steril, kemudian diinkubasi dalam incubator (Memmert, Jerman) pada suhu 37°C, sampai sel monolayer terbentuk.

Sel fibroblas diambil dari kultur sel *BHK-21* dalam bentuk *cell-line* ditanam dalam botol *Roux*. Media pada botol *Roux* yang berisi sel fibroblas *BHK-21* dibuang dan dicuci dengan *Phosphate Buffer Saline (PBS)* (Sigma-Aldrich, USA) 15 ml sebanyak 3-5 kali. Botol *Roux* diisi dengan *trypsin versene* (Lonza™, USA) 1 ml. Sel-sel dalam botol tersebut akan terlihat menggerombol kemudian dihomogenisasikan dengan media *Eagles* sebanyak 10 ml. Sel yang telah homogen dimasukkan ke dalam *microplate 96 well* (TPP®, Swiss) dengan kepadatan 2×10^5 sel/ml sebanyak 50 µl dan diinkubasi selama 24 jam.

d. *Tahapan Perlakuan*^{18,19}

Microplate yang berisi sel fibroblas diamati dibawah mikroskop cahaya (Nikon ECLIPSE TE2000-U, Jepang) untuk melihat apakah sel yang ditanam telah cukup banyak untuk dilakukan perlakuan. Sel fibroblas yang sudah didistribusikan dalam sumuran dibagi menjadi 9 kelompok perlakuan, yaitu kelompok I sebagai kontrol negatif berisi media, kelompok II sebagai kontrol positif yang berisi kultur sel fibroblas, kelompok III - IX sebagai kelompok

penelitian yang berisi kultur sel fibroblas yang dipaparkan ekstrak kulit kakao dengan konsentrasi 1,56%, 3,125%, 6,125%, 12,5%, 25%, 50%, dan 100% dimana masing-masing sumuran berisi 25 μ l

Setiap perlakuan memiliki 7 replikasi yang ditanam dalam well. Selanjutnya *microplate* diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C

e. Pengamatan dan Pembacaan Hasil

Perlakuan^{18,19}

Media dan ekstrak kulit kakao yang berada di dalam *microplate* dibuang kemudian dicuci dengan *PBS*. Garam *MTT* (SIGMA, USA) dilarutkan dalam *PBS* 5 mg/ml, kemudian di teteskan ke setiap *well* sebanyak 10 μ l. Kemudian diinkubasi kembali selama 2-4 jam pada suhu 37°C.

Dimethylsulfoxide (*DMSO*) (Sigma-Aldrich, USA) ditambahkan sebanyak 50 μ l ke setiap *well* dan digetarkan dengan alat *shaker* selama 5 menit hingga kristal formazan terlarut. Pembacaan nilai densitas optik formazan dengan *Elisa reader* (Thermo Fisher Scientific, USA) pada panjang gelombang 620 nm. Semakin pekat warna, semakin tinggi nilai absorbansinya dan semakin banyak jumlah sel fibroblas yang hidup. Sel fibroblas yang hidup akan menjadi warna ungu, sedangkan sel yang mati tidak terbentuk warna ungu.

Sel yang mati kemudian dihitung persentasenya dengan menggunakan rumus¹⁸:

$$\% \text{ Sel hidup} = \frac{\text{OD perlakuan} - \text{OD media}}{\text{OD kontrol sel} - \text{OD media}}$$

$$\% \text{ Sel mati} = 100\% - \% \text{ sel hidup}$$

Hasil penghitungan didasarkan pada nilai IC_{50} . IC_{50} ekstrak kulit kakao adalah konsentrasi dari ekstrak yang menghambat pertumbuhan sel fibroblas sebesar 50% dari kontrol sel yang diperoleh dari nilai rerata persentase kehidupan sel.

Jika sel yang mati > 50% artinya ekstrak kakao bersifat toksik. Jika sel yang mati < 50% artinya ekstrak kakao bersifat tidak toksik²⁰.

HASIL

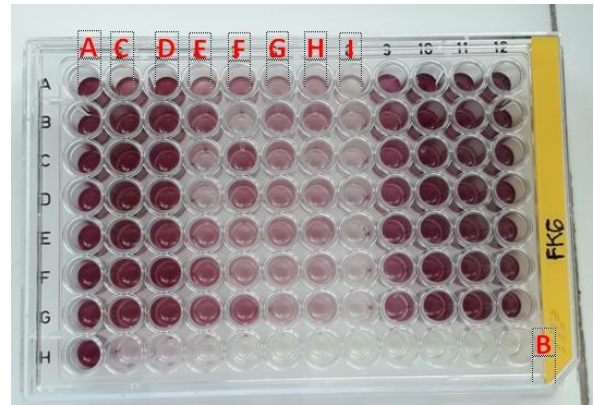
Hasil pengamatan mengenai sitotoksisitas ekstrak kulit kakao (*Theobroma cacao*) dengan pengenceran pada konsentrasi 1,56%, 3,125%, 6,125%, 12,5%, 25%, 50%, dan 100% terhadap kultur sel fibroblas *BHK-21* yang dilakukan dengan menggunakan metode *MTT Assay* dan dibaca dengan alat *ELISA reader* dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Nilai rata-rata *optical density*, persentase sel hidup, dan persentase sel mati pada setiap kelompok perlakuan

Kelompok Perlakuan	$\bar{x} \pm SD$	% Sel Hidup	% Sel Mati	N
(1) Kontrol sel	0,60 \pm 0,0037	100%	0%	7
(2) Kontrol media	0,07 \pm 0,032	0%	0%	7
(3) Ekstrak 1,56%	0,45 \pm 0,015	71,7%	28,3%	7
(4) Ekstrak 3,125%	0,42 \pm 0,020	66,4%	33,6%	7
(5) Ekstrak 6,25%	0,20 \pm 0,016	24,5%	75,5%	7
(6) Ekstrak 12,5%	0,22 \pm 0,076	28,3%	71,7%	7
(7) Ekstrak 25%	0,18 \pm 0,066	20,8%	79,2%	7
(8) Ekstrak 50%	0,17 \pm 0,050	18,9%	81,1%	7
(9) Ekstrak 100%	0,12 \pm 0,081	9,4%	90,6%	7

Keterangan :

- \bar{x} : Nilai rata-rata *optical density*
- SD : Standar deviasi/simpangan baku
- N :Jumlah kelompok tiap perlakuan



Gambar 2. Hasil pada *microplate* setelah perlakuan

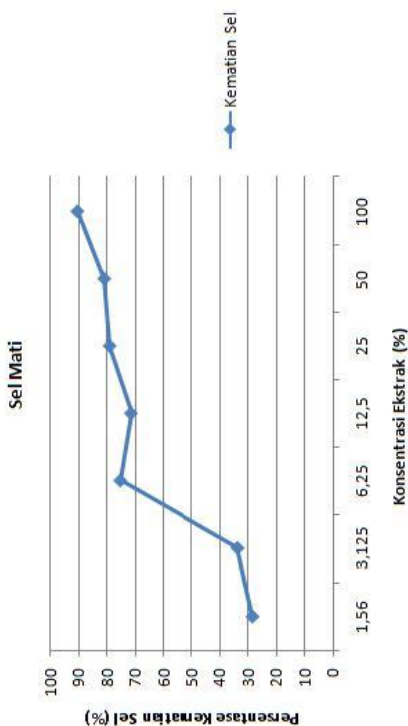
Keterangan

- A: Kontrol sel
- B: Kontrol media
- C: Perlakuan ekstrak konsentrasi 1,56%
- D: Perlakuan ekstrak konsentrasi 3,125%
- E: Perlakuan ekstrak konsentrasi 6,25%
- F: Perlakuan ekstrak konsentrasi 12,5%
- G: Perlakuan ekstrak konsentrasi 25%
- H: Perlakuan ekstrak konsentrasi 50%
- I: Perlakuan ekstrak konsentrasi 100%

Berdasarkan data tabel 1 dan gambar grafik 1 semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka nilai *optical density* semakin rendah. *Optical density* yang rendah menunjukkan tingkat sel hidup yang rendah (sel mati tinggi). Dari gambar 2 juga dapat diketahui bahwa intensitas warna formazan dari sumuran C (konsentrasi 1,56%) hingga I (konsentrasi 100%) mengalami penurunan. Intensitas atau kepekatan warna formazan berbanding lurus dengan jumlah sel hidup.

Analisis Data

Pada data hasil pengukuran *optical density* menggunakan *Elisa reader*, dilakukan uji normalitas menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov untuk melihat apakah data yang didapat berdistribusi normal. Data dikatakan



Gambar 1. Grafik rata-rata persentase

kematian sel fibroblas padamasing-masingkonsentrasi

berdistribusi normal apabila $p > 0,05$. Pada masing-masing kelompok perlakuan diperoleh nilai $p > 0,05$, artinya data yang didapatkan berdistribusi normal. Kemudian dilanjutkan dengan *Levene's test* untuk mengetahui homogenitas data sebagai syarat uji signifikansi menggunakan ANOVA. Diperoleh hasil $p = 0,000$ ($p < 0,05$) yang menunjukkan data bersifat tidak homogen. Oleh karena itu, uji signifikansi dilakukan menggunakan uji non parametrik melalui analisis *Kruskall Wallis test* dan didapatkan hasil $p = 0,000$ ($p < 0,05$) yang menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada kelompok perlakuan. Selanjutnya untuk mengetahui adanya perbedaan kemaknaan antar perlakuan terhadap kelompok kontrol, maka digunakan uji *Post-Hoc comparison test* menggunakan metode *Tukey HSD*.

Analisis perbedaan antar kelompok perlakuan menggunakan metode *Tukey HSD*

Perlakuan	Kontrol Sel	Kontrol Media	Ekstrak 1,56%	Ekstrak 3,125%	Ekstrak 6,25%	Ekstrak 12,5%	Ekstrak 25%	Ekstrak 50%	Ekstrak 100%
Kontrol Sel	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kontrol Media	0,000*	-	-	-	-	-	-	-	-
Ekstrak 1,56%	0,000*	0,000*	-	-	-	-	-	-	-
Ekstrak 3,125%	0,000*	0,000*	0,928	-	-	-	-	-	-
Ekstrak 6,25%	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	-	-	-	-	-
Ekstrak 12,5%	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	1,00	-	-	-	-
Ekstrak 25%	0,000*	0,003*	0,000*	0,000*	0,988	0,853	-	-	-
Ekstrak 50%	0,000*	0,001*	0,001*	0,000*	0,969	0,77	1,00	-	-
Ekstrak 100%	0,000*	0,672	0,001*	0,000*	0,033*	0,007*	0,287	0,375	-

Hasil uji *Tukey HSD* menunjukkan

* = signifikan ($p < 0,05$) b. Tanpa tanda = tidak signifikan ($p > 0,05$)

bahwa terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol sel dengan semua kelompok perlakuan. Pada konsentrasi 1,56% didapatkan perbedaan bermakna dengan semua kelompok perlakuan kecuali terhadap konsentrasi 3,125%. Pada konsentrasi 6,25% tidak didapatkan perbedaan bermakna dengan konsentrasi 12,5%, 25% dan 50%. Pada konsentrasi 25% tidak didapatkan perbedaan bermakna dengan konsentrasi 50% dan 100%. Pada konsentrasi 50% tidak didapatkan perbedaan bermakna dengan konsentrasi 100%. Berdasarkan hasil uji tersebut, diketahui ekstrak kulit kakao konsentrasi 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, dan 100% memiliki efek sitotoksik terhadap sel *BHK-21*.

DISKUSI

Uji sitotoksisitas merupakan bagian awal dari evaluasi suatu bahan kedokteran gigi sebelum digunakan pada manusia¹³. Metode yang paling sering digunakan adalah *Microculture Tetrazolium Technique Assay (MTT Assay)* dengan menggunakan pereaksi *MTT 3-(4,5- dimethylthiazol- 2-yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide*¹⁴.

Metode *MTT* didasarkan pada pengukuran terhadap aktivitas mitokondria sel hidup. Sel yang masih hidup dan metabolismenya aktif, dapat mengubah garam *MTT* yang semula berwarna kuning menjadi produk formazan berwarna ungu melalui reaksi reduksi^{15,21}.

Intensitas warna dari kristal formazan dalam *microplate 96 well* kemudian dibaca

menggunakan *Elisa reader*. Absorbansi yang dihasilkan akan sebanding dengan jumlah sel yang hidup. Semakin pekat warna yang ditunjukkan, maka semakin tinggi nilai absorbansinya dan semakin banyak jumlah sel yang hidup²².

Metode *MTT Assay* memerlukan inkubasi reagen dengan kultur sel hidup¹⁵. Kultur sel yang paling banyak digunakan adalah sel fibroblas *Baby Hamster Kidney-21 (BHK-21)* yang berasal dari ginjal bayi hamster. Sel ini paling banyak digunakan untuk pengujian terhadap tingkat sitotoksitas suatu material kedokteran gigi dikarenakan memiliki bentuk dan kemampuan yang mirip dengan fibroblas manusia dalam memproduksi *growth factor* serta memiliki karakteristik mudah dikultur, lebih stabil, lebih sensitif, dan sulit untuk mengalami mutasi jika dibandingkan dengan sel fibroblas manusia^{23,22,24,14}. Pada penelitian ini kultur sel fibroblas diperoleh dari Laboratorium Peningkatan Mutu dan Pengembangan Produksi Pusat Veteriner Farma (PUSVETMA) Surabaya.

Kulit kakao didapatkan dari PT. Perkebunan Nusantara XII-Kebun Kaliklatak Banyuwangi berjenis *Forastero*. Pembuatan ekstrak dan uji fitokimia dilakukan di Balai Penelitian dan Konsultasi Industri (BPKI) Surabaya untuk mengetahui isi kandungan senyawa aktif di dalam ekstrak kulit kakao. Pada hasil uji

fitokimia didapatkan senyawa aktif berupa alkaloid sebanyak 5,06%, flavonoid 3,91%, tanin 6,11%, saponin 4,05% dan terpenoid 2,94% yang dapat berpengaruh pada kematian sel fibroblas.

Alkaloid merupakan senyawa aktif hasil metabolisme sekunder yang terkandung dalam tumbuh-tumbuhan termasuk pada kulit kakao. Efek sitotoksik yang dihasilkan oleh alkaloid dapat menyebabkan terjadinya kebocoran pada membran sel fibroblas *BHK-21*. Alkaloid juga dapat mempengaruhi DNA sel, yakni dengan cara menyisipkan agen interkalasi ke dalam susunan basa di dalam DNA heliks ganda sehingga menyebabkan terjadinya pergeseran kerangka basa dan mengakibatkan terganggunya proses replikasi, perbaikan, serta topoisomerase yang berakibat pada apoptosis sel²⁵.

Flavonoid merupakan kelompok metabolit sekunder yang banyak ditemukan pada tanaman. Pada konsentrasi yang relatif tinggi, flavonoid bersifat prooksidan karena dapat memicu pembentukan ROS sehingga menimbulkan efek toksik pada sel. Mekanisme kerja dari flavonoid yakni dengan menginaktivasi sel, menghambat proliferasi sel, menghambat peroksidasi lipid, inaktivasi radikal oksigen dan inaktivasi oksidasi DNA yang selanjutnya membuat sel mengalami. Sedangkan pada konsentrasi rendah, flavonoid bersifat sebagai antioksidan²⁷. Mekanisme kerja dari flavonoid yakni dengan menangkap radikal bebas

sehingga mencegah oksidasi sel dan denaturasi protein^{28,29}.

Tanin merupakan senyawa aktif metabolit sekunder turunan polifenol. Pemberian tanin dalam konsentrasi tinggi dapat menyebabkan terjadinya genotoksik³⁰. Ikatan antar senyawa polar pada tanin dengan lipoprotein sel dapat menyebabkan terjadinya penimbunan senyawa dan pemecahan lemak. Akibatnya, permeabilitas sel fibroblas menjadi terganggu sehingga sel menjadi nekrosis³¹.

Saponin merupakan kelompok glikosida yang banyak ditemukan pada tanaman, termasuk kulit buah kakao. Dalam senyawa saponin, terdapat molekul ampifatik (mengandung regio hidrofilik dan hidrofobik) yang dapat melarutkan protein membran. Ketika ujung hidrofobik saponin berikatan dengan regio hidrofobik protein membran sel, akan menyebabkan pergeseran pada sebagian besar unsur lipid yang terikat. Sedangkan ujung hidrofilik saponin yang merupakan ujung bebas akan membawa protein ke dalam larutan sebagai kompleks deterjen-protein. Akibatnya membran sel akan pecah dan mengalami lisis, kemudian menyebabkan sel mengalami nekrosis³¹. Saponin juga memiliki kemampuan untuk menginduksi apoptosis pada kultur sel fibroblas³².

Terpenoid merupakan senyawa hidrokarbon alami yang dapat ditemui

pada tumbuhan. Senyawa ini dapat berinteraksi dengan protein membran dan biomembran yang kemudian dapat menyebabkan ketidakstabilan ion dan metabolit dalam sel. Ketidakstabilan antara ion dan metabolit sel akan menyebabkan apoptosis³³.

Hasil uji statistik pada data penelitian menunjukkan bahwa data berdistribusi normal namun memiliki variasi yang tidak homogen, sehingga analisis statistik selanjutnya dilakukan dengan uji non parametrik melalui uji *Kruskall Wallis* dan didapatkan hasil bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara jumlah sel yang hidup dari kelompok perlakuan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak, nilai absorbansi yang didapatkan semakin rendah. Hal ini menandakan adanya penurunan jumlah sel hidup atau peningkatan jumlah sel fibroblas *BHK-21* yang mati seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak kulit kakao. Pada konsentrasi 1,56% dan 3,125% didapatkan jumlah rata-rata sel mati kurang dari 50% sehingga dapat dikatakan bahwa pada konsentrasi tersebut ekstrak kulit kakao bersifat tidak toksik. Hal ini dapat dikarenakan adanya aktivitas flavonoid sebagai zat antioksidan yang memberikan efek aman terhadap sel fibroblas, sehingga membuat sel fibroblas menjadi tetap hidup (viabel). Sedangkan, pada konsentrasi 6,25%, 12,5%, 25%, 50% dan 100% jumlah rata-rata sel mati lebih dari 50% sehingga dapat dikatakan bahwa pada konsentrasi ini ekstrak kulit kakao bersifat

toksik, yang menandakan bahwa efek antioksidan senyawa flavonoid mulai berkurang. Adanya kenaikan konsentrasi pada ekstrak kulit kakao kemudian mengubah sifat flavonoid menjadi prooksidan. Flavonoid, alkaloid, saponin, tanin dan terpenoid kemudian secara bersama-sama mempengaruhi sel fibroblas dengan mengakibatkan apoptosis dan nekrosis pada sel.

Secara keseluruhan penghitungan persentase jumlah sel fibroblas *BHK-21* yang mati setelah dipaparkan ekstrak kulit kakao (*Theobroma cacao*) dengan konsentrasi 1,56%, 3,125%, 6,125%, 12,5%, 25%, 50%, dan 100% secara berurutan adalah 28,3%, 33,6%, 75,5%, 71,7%, 79,2%, 81,1%, dan 90,6%. Berdasarkan parameter IC_{50} , ekstrak kulit kakao dengan konsentrasi 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, dan 100% termasuk dalam kategori toksik karena persentase sel yang mati lebih dari 50%, sedangkan konsentrasi 1,56% dan 3,125% bersifat tidak toksik karena persentase sel yang mati kurang dari 50%.

Pada penelitian ini didapatkan data bahwa pengaruh penambahan konsentrasi ekstrak kulit kakao berbanding lurus dengan peningkatan jumlah sel fibroblas *BHK-21* yang mati. Namun belum diketahui, apakah ekstrak kulit kakao juga memberikan efek dengan pola yang sama terhadap sel fibroblas yang berasal dari

rongga mulut. Data penelitian juga menunjukkan bahwa pada konsentrasi 6,25% ekstrak kulit kakao memberikan efek sitotoksik, sedangkan pada konsentrasi 3,125% bersifat terapeutik. Hasil uji signifikansi antar kelompok menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara konsentrasi 6,25% dan 3,125%. Namun, belum diketahui secara pasti bagaimana efek ekstrak kulit kakao pada rentang antara konsentrasi 6,25% dan 3,125% terhadap sel fibroblas *BHK-21*. Maka dari itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai sitotoksitas ekstrak kulit kakao terhadap kultur sel fibroblas yang berasal dari rongga mulut manusia dan pengaruh ekstrak kulit kakao pada konsentrasi antara 3,125% dan 6,25%.

REFERENCES

1. Gutmann, J. L., & Regan, J. D. Preparation of the Root Canal System. In: Ford T. R. P. *Harty's Endodontics in Clinical Practice*. 5th Ed. Inggris: Elsevier. 2004: 77.
2. Shahani & Reddy, S. Comparison of Antimicrobial Substantivity of Root Canal Irrigants in Instrumented Root Canals up to 72 h: an in vitro study. *Journal of the Indian Society of Pedodontics & Preventive Dentistry*. 2011; 29: 28-33
3. Gusiyska, A. Effective Root Canal Irrigation – A Key Factor of endodontic Treatment. *International Journal of Recent Scirntific Research*. 2016; 10(8): 3400-3419.
4. Haapasalo, M., Shen, Y., Wang, Z. & Gao, Y. Irrigation in Endodontics. *British Dental Journal*. 2014; 216(6): 299-303.
5. Lam, T. S. K., Wong, O. F. & Tang, S. Y. H. A Case Report of Sodium Hypochlorite. *Hong Kong Journal of Emergency Medicine*. 2010; 17(2): 174-

- 175.
6. Chaugule, V. B., Panse, A. M., & Gawali, P. M. Adverse Reaction of Sodium Hypochlorite during Endodontic Treatment of Primary Teeth. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*. 2015; 8(2): 153-156
 7. Karmawati, I., Mahmud, Z., Syakir, M., Munarso, S. J., Ardana, I. K., & Rubiyo. Budidaya dan Pascapanen Kakao. *Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan*. 2010: 1-12.
 8. Rubiyo. Inovasi Teknologi Perbaikan Bahan Tanam Kakao di Indonesia. *Buletin RISTRI*. 2013; 4(3): 199-214.
 9. Rachmawaty., Mu'nisa, A., & Hasri. Analisis Fitokimia Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao L.*) sebagai Kandidat Antimikroba. 2017: 667-670.
 10. Loppies, J. E., & Yumnas, M. Ekstraksi Komponen Aktif Kulit Buah Kakao dan Pemanfaatannya sebagai Bahan Pengawet Alami pada Produk Makanan. *Jurnal Industri Hasil Perkebunan*. 2014; 9(2): 59-67.
 11. Chandra, H., Parul, B., Archana, Y., Babita, P., Abhay, P. M., & Amant, R. N. Antimicrobial Resistance and The Alternative Resources with Special Emphasis of Plant-Based Animicrobials. *Journal of Plants*. 2017; 6(16): 1-11.
 12. Yuanita, T., Putri, D. A., Rukmo, M., Zubaidah, N., Wahjuningrum, D. A., & Kunarti, S. Antibiofilm Power of Cocoa Bean Pod Husk Extract (*Theobroma cacao*) Against *Enterococcus faecalis* Bacteria (In Vitro). *International Medical Device and Technology Conference 2017*. 2017: 129-131.
 13. Yuliati, A. Viabilitas Sel Fibroblas *BHK-21* pada Permukaan Resin Akrilik Rapid Heat Cured. *Majalah Kedokteran Gigi* (Dent. J). 2005; 38(2): 68-72.
 14. Khoswanto, C. Uji Sitotoksisitas Dentin Kondisioner Asam Sitrat 50% Menggunakan *MTT Assay*. *Dental Journal*. 2008; 41: 103-106.
 15. Riss, T., Moravec, R., Niles, A., Duellman, S., Benik, H., Worzella, T., & Minor, L. Cell Viability Assay. *Assay Guidance Manual*. 2016: 1-4.
 16. Mulyatni, A. S., Budiani, A., & Taniwiryo, D. *Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Kakao (Theobroma cacao L.) Terhadap Escherichia coli, Bacillus subtilis, dan Staphylococcus aureus*. 2012: 77-84.
 17. Sulaiman, A. Y., Astuti, P., & Shita, A. D. P. Uji Antibakteri Ekstrak Daun Kersen (*Muntingia Calabura L.*) Terhadap Koloni *Streptococcus viridians*. *Indonesian Journal for Health Sciences*. 2017; 1(2): 1-6.
 18. Freshney, R. I. *Culture of Animal Cell: A Manual of Basic Technique and Specialized*. 6th ed. New York: Wiley Liss Inc. 2010: 108, 243.
 19. Meizarini, Asti. Perbedaan Konsentrasi Bahan Pemutih Gigi Terhadap Sitotoksisitas Menggunakan *Assay MTT*. *Jurnal Penelitian Media Eksakta*. 2009; 8(1): 9-10.
 20. Nalbantsoy, A., Karabay, Y. N. U., Sayim, F., Deliloglu, G., Gocmen, B., Arikan, H., & Yildiz, M. Determination of *in vivo* Toxicity and *in vitro* Cytotoxicity of Venom from the Cypriot Blunt-Nosed Viper *Macrovipera lebetina lebetina* and Antivenom Production. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 2012; 18(2): 208-216.
 21. Bahuguna, A., Khan, I., Bajpai, V. K., & Kang, S. C.. *MTT Assay to Evaluate the Cytotoxic Potential of a Drug*. *Bangladesh J Pharmacol*. 2017; 12: 115-118.
 22. Emilda, Y., Budiprmana E., & Kuntari, S. Uji Sitotoksisitas Ekstrak Bawang Putih (*Allium sativum*) Terhadap Kultur Sel Fibroblas. *Dental Journal*. 2014; 47(4): 215-219.
 23. Dewi, T. P. Efek Sitotoksik Tetrahydrozoline Hcl Terhadap Viabilitas Sel Fibroblas. *Interdental Jurnal Kedokteran Gigi*. 2007; 5(1).
 24. Holland, G. R., & Torabinejad, M. The Dental Pulp and Periradicular Tissues. In:

- Walton, R. E, Torabinejad, M. *Endodontics Principles and Practice*. 4th Ed. Missouri: Elsevier. 2009: 263.
25. Fattorusso, E., & Scafati, O. T.. *Modern Alkaloids Structure, Isolation, Synthesis and Biology*. Jerman: Wiley-VCH. 2008: 4, 17.
26. Chahar, M. K., Sharma, N., Dobhal, M. P., & Joshi, Y. C. Flavonoids : A versatile source of anticancer drugs. *Pharmacogn Rev*. 2011; 5(9): 1-12.
27. Matsuo, M., Sasaki, N., Saga, K., & Kaneko, T. Cytotoxicity of Flavonoids Toward Cultured Normal Human Cells. *Biol Pharm Bulletin*. 2005; 28(2): 253-258.
28. Simanjuntak, K. Peran Antioksidan Flavonoid dalam Meningkatkan Kesehatan. *Bina Widya*. 2012; 23(3): 135-140.
29. Banjarnahor, S., D., S., & Artanti, N. Antioxidant Properties of Flavonoid. *Med J Indones*. 2014; 23(4): 239-244.
30. Radak, M. S., & Andjelkovic, M. Studying Genotoxic and Anti Mutagenic Effect of Plants Extracts in *Drosophila* Test System. *Botanica Serbica*. 2016; 40(1): 22.
31. Farkhan, A., Arijani, E., & Yuliati. Toksisitas Kandungan Tanin dan Saponin pada Ekstrak Daun Mimba (*Azadirachta indica*) dengan Menggunakan *MTT Assay*. *Oral Biology Dental Journal*. 2012; 4 (2): 28-32.
32. Gunawan, C., Mulawarmanti, D., & Laihad, F. Sitotoksisitas Ekstrak Daun *Avicennia marina* terhadap Sel Fibroblas. *Dental Jurnal Kedokteran Gigi*. 2014; 8(2): 69.
33. Wink. Modern Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites. *Journal Medicines*. 2015; 2: 251-286.