

Research Article

Subacute Toxicity Test of Cocoa Bean Extract (*Theobroma cacao L.*) on Mice (*Mus musculus L.*)

Hendri Poernomo, Setiawan

Oral Surgery Department, Faculty of Dentistry, Universitas Mahasaraswati Denpasar, Indonesia

Received date: May 22, 2024

Accepted date: June 28, 2024

Published date: August 1, 2024

KEYWORDS

Cocoa bean extract, hepatic histopathology of mice, subacute toxicity test



DOI : 10.46862/interdental.v20i2.9105

ABSTRACT

Introduction: Cocoa is one of the plants that is believed to have many health benefits and is used in herbal medicine so it is necessary to test the safety of its use. The purpose of the study was to determine abnormalities in the hepatic histopathology of mice that occurred after repeated administration of the test preparation.

Materials and Methods: The research used in vivo laboratory experiments with the post-test only control group approach. The samples used were 25 consisting of 5 groups, namely the group of mice given cocoa bean extract at a dose of 4500 mg/kgBB, 5500 mg/kgBB, 6500 mg/kgBB, 7500 mg/kgBB, and the control group was given distilled water, and for the allergy test was given 32% cocoa bean extract gel. Oral administration of the test preparation was carried out every day for 28 days, once a day. Observations included toxic symptoms by looking at hepatic organ histopathology. Data analysis used Kruskal Wallis test followed by Mann Whitney test for subacute toxicity test.

Results and discussion: showed that the administration of cocoa bean extract at doses of 4500 mg/kgBB, 5500 mg/kgBB, 6500 mg/kgBB, and 7500 mg/kgBB had an effect on subacute toxicity at the time of administration to mice which caused the death of mice and affected the hepatic histopathology of mice.

Conclusion: The conclusion is that cocoa bean extract at certain doses has an effect on subacute toxicity in mice.

Corresponding Author:

Hendri Poernomo
Oral Surgery Department, Faculty of Dentistry
Universitas Mahasaraswati Denpasar, Indonesia
Email: hendri_poernomo@yahoo.co.id

How to cite this article: Poernomo H, Setiawan. (2024). Subacute Toxicity Test of Cocoa Bean Extract (*Theobroma cacao L.*) on Mice (*Mus musculus L.*). Interdental Jurnal Kedokteran Gigi 20(2), 191-98. DOI: 10.46862/interdental.v20i2.9105

Copyright: ©2024 **Hendri Poernomo** This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License. Authors hold the copyright without restrictions and retain publishing rights without restrictions.

UJI TOKSISITAS SUBAKUT EKSTRAK BIJI KAKAO (*Theobroma cacao L.*) TERHADAP MENCIT (*Mus musculus L.*)

ABSTRAK

Pendahuluan: Kakao merupakan salah satu tanaman yang dipercaya memiliki banyak manfaat di bidang kesehatan dan digunakan dalam pengobatan herbal sehingga perlu dilakukan uji keamanan dalam penggunaannya. Tujuan penelitian untuk mengetahui kelainan pada histopatologi hepar mencit yang terjadi setelah pemberian sediaan uji secara berulang.

Bahan dan Metode penelitian: digunakan eksperimental laboratorium secara *in vivo* dengan pendekatan *the post-test only control group*. Sampel yang digunakan 25 yang terdiri dari 5 kelompok, yaitu kelompok mencit yang diberikan ekstrak biji kakao dengan dosis 4500 mg/kgBB, 5500 mg/kgBB, 6500 mg/kgBB, 7500 mg/kgBB, dan kelompok kontrol diberi aquades, serta untuk uji alergi diberi gel ekstrak biji kakao 32%. Pemberian sediaan uji secara oral dilakukan setiap hari selama 28 hari, satu kali dalam sehari. Pengamatan meliputi gejala toksik dengan melihat histopatologi organ hepar. Analisis data menggunakan uji *Kruskal Wallis* dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk uji toksisitas subakut.

Hasil dan Pembahasan: menunjukkan pemberian ekstrak biji kakao pada dosis 4500 mg/kgBB, 5500 mg/kgBB, 6500 mg/kgBB, dan 7500 mg/kgBB berpengaruh terhadap toksisitas subakut pada saat pemberian kepada mencit yang menyebabkan kematian mencit dan mempengaruhi histopatologi hepar mencit.

Kesimpulan: ekstrak biji kakao dengan dosis tertentu berpengaruh terhadap toksisitas subakut pada mencit.

KATA KUNCI: Ekstrak biji kakao, histopatologi hepar mencit, uji toksisitas subakut

PENDAHULUAN

Indonesia dikenal sebagai gudangnya tumbuhan obat (herbal) sehingga mendapat julukan *live laboratory*. Masyarakat Indonesia beranggapan bahwa pengobatan alternatif lebih aman karena berupa obat herbal yang tidak menggunakan bahan kimia yang berbahaya bagi kesehatan dan dilestarikan penggunaannya secara empiris.^{1,2}

Kakao merupakan salah satu tanaman yang dipercaya memiliki banyak manfaat di bidang kesehatan dan digunakan dalam pengobatan herbal. Indonesia memiliki tanaman kakao yang cukup banyak, terbukti dari Indonesia yang merupakan produsen kakao terbesar di dunia urutan ke-3 setelah Pantai Gading dan Ghana.³

Senyawa kimia yang terdapat pada biji kakao antara lain flavonoid, katekin, epikatekin, theobromine, kafein, dan polifenol.^{4,5} Senyawa flavonoid, saponin, tannin dan katekin memiliki fungsi sebagai antioksidan, sedangkan theobromine memiliki fungsi sebagai antimikroba.^{4,5} Flavonoid mampu mengurangi proses inflamasi melalui hambatan terhadap pembentukan prostaglandin yang dibentuk oleh asam *arachidonate* dan mediator inflamasi lain seperti histamin dan serotonin.⁶

Mekanisme biji kakao yang berfungsi sebagai antioksidan yaitu dengan memotong reaksi berantai radikal bebas.⁷

Mengingat betapa luas dan seringnya penggunaan biji kakao ini sebagai obat herbal, maka penggunaan tumbuhan ini harus melalui serangkaian uji, seperti uji khasiat farmakologi dan uji keamanan melalui uji toksisitas dan uji alergi kemudian bisa diikuti dengan isolasi komponen murninya.⁸ Hal ini dilakukan agar kandungan senyawa aktif pada gel ekstrak biji kakao terbukti aman jika digunakan sebagai pengobatan herbal.⁹

Efek toksik obat-obatan dapat diamati dari morfologi dan histologi hepar, dikarenakan hepar berperan dalam metabolisme semua obat dan bahan-bahan asing yang masuk dalam tubuh. Hepar akan mengubah struktur obat yang lipofilik menjadi hidrofilik sehingga mudah dikeluarkan dari tubuh melalui urin atau empedu.^{10,11}

Pada penelitian sebelumnya mengenai pengaruh pemberian ekstrak biji kakao terhadap jumlah sel fibroblast pada penyembuhan luka insisi gingiva marmut jantan didapatkan hasil bahwa pemberian gel ekstrak biji kakao dengan konsentrasi 32% lebih efektif dalam meningkatkan kepadatan kolagen pada luka sayat yang terinfeksi *Staphylococcus aureus* pada marmut dibandingkan konsentrasi 16% dan 24%.¹²

Penelitian mengenai efektivitas gel ekstrak biji kakao (*Theobroma cacao L.*) terhadap jumlah sel fibroblast juga dilakukan pada soket pasca pencabutan gigi tikus wistar jantan dan didapatkan hasil bahwa pemberian gel ekstrak biji kakao efektif dalam meningkatkan jumlah sel fibroblast dan konsentrasi gel ekstrak biji kakao 16% terbukti paling efektif dalam meningkatkan jumlah sel fibroblast pada soket pasca pencabutan gigi tikus wistar jantan.¹³ Pada penelitian lainnya diperoleh hasil bahwa ekstrak biji kakao (*Theobroma cacao L.*) 16% juga terbukti efektif dalam meningkatkan re-epitelialisasi soket pasca pencabutan gigi tikus wistar.¹⁴

Penelitian mengenai efek imunomodulasi ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao L.*) terhadap aktivitas dan kapasitas fagositosis sel makrofag peritoneum mencit yang diinfeksi bakteri *Staphylococcus epidermidis* menyatakan bahwa uji toksisitas akut ekstrak biji kakao dengan dosis 0,65 mg/grBB, 1,3 mg/grBB, dan 2,6 mg/grBB yang diamati selama 24 jam dengan tiga ekor mencit sebagai sampel pada setiap kelompok tidak menimbulkan efek toksik dan kematian pada mencit.¹⁵

Pada penelitian ini akan dilakukan uji keamanan yaitu uji toksisitas subakut menggunakan mencit (*Mus musculus*) sebagai hewan coba secara *in vivo*. Dosis ekstrak biji kakao yang akan digunakan yaitu 4500 mg/kgBB, 5500 mg/kgBB, 6500 mg/kgBB, dan 7500 mg/kgBB mencit. Setelah pemberian ekstrak diperlukan pengamatan lebih lanjut mengenai histopatologi hepar, tingkah laku dan respon hipersensitivitas permukaan tubuh. Adanya uji tersebut diharapkan dapat diperoleh batas aman penggunaan suatu bahan agar tidak terjadi efek toksik dan alergi.

BAHAN DAN METODE

Rancangan penelitian yang digunakan yaitu metode kuasi eksperimental laboratorium secara *in vivo* dengan pendekatan *the post-test only control group*.

Sampel penelitian dipergunakan mencit jantan atau betina berusia 2-3 bulan dengan berat badan 20-30gram. Mencit dipelihara terlebih dahulu di laboratorium selama satu minggu untuk beradaptasi, mengontrol berat badan

dan kondisi tubuh, serta penyeragaman makanan sehingga mencit yang digunakan untuk penelitian dalam keadaan sehat. Dalam penelitian ini menggunakan 5 kelompok percobaan, maka jumlah hewan coba untuk semua kelompok uji secara keseluruhan adalah 25 ekor.

Teknik sampling yang digunakan adalah *simple random sampling*. Sampel hewan coba terbagi dalam 5 kelompok dengan perlakuan ekstrak biji kakao dengan dosis 4500 mg/kgBB, 5500 mg/kgBB, 6500 mg/kgBB, dan 7500 mg/kgBB dan kelompok kontrol diberi aquadest secara oral.

Alat dan bahan penelitian : preparat hewan coba, kawat, mikroskop, alat gelas, alat bedah, alat destilasi, blender, lemari pengering, *rotary evaporator*, neraca, hewan, neraca digital, sentrifuge, spuit, pinset, oral sonde, preparat hpa, pot sampel, tisu, masker, *handscone*, kandang mencit. Bahan: ekstrak biji kakao 32%, anestesi (*ketamin, xylazine*), air suling (*aquadest*), etanol 96%, hematoksin-eosin (he), mencit jantan atau betina berusia 2-3 bulan dengan bobot 20-30 gram, makanan dan minuman mencit. Analisis data dengan uji *One Way Anova* atau uji *Kruskal Wallis* dan *Mann Whitney* karena penelitian ini menggunakan lebih dari dua kelompok perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji fitokimia diketahui terdapat kandungan zat aktif dalam biji kakao yaitu flavonoid dan kuinon yang dibuktikan dengan adanya endapan berwarna putih kekuningan pada pengujian flavonoid dan terbentuknya larutan berwarna merah kecokelatan pada pengujian kuinon. Hasil uji *spektrofotometri* kadar flavonoid total ekstrak biji kakao dalam penelitian ini yaitu 82,100 mgQE/100g atau 8,21%/100g ekstrak biji kakao.

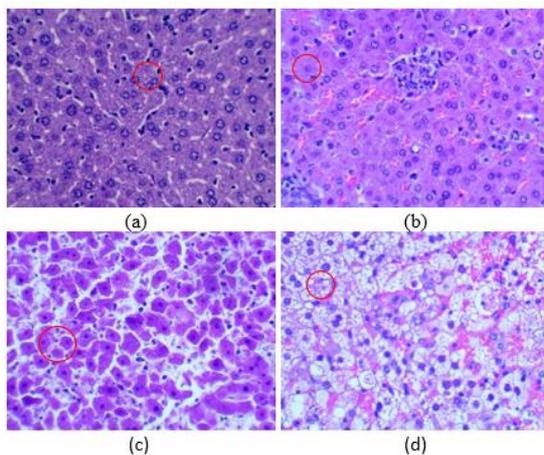
Penelitian ini menggunakan 25 sampel hepar mencit dalam pengujian toksisitas subakut. Data yang terkumpul merupakan data kematian mencit akibat pemberian sediaan uji (Tabel 1)

Tabel 1. Hasil pengamatan jumlah kematian mencit

Kelompok	Hari ke-1	Hari ke-2	Hari ke-3	Jumlah Kematian Mencit
Kontrol	-	-	-	0
P1 4500 mg/kgBB	1	2	2	5
P2 5500 mg/kgBB	1	3	1	5
P3 6500 mg/kgBB	3	2	-	5
P4 7500 mg/kgBB	4	1	-	5

Berdasarkan Tabel 1 yang menunjukkan bahwa kematian mencit dimulai pada hari ke-1 (30, 60, 90 menit setelah pemberian sediaan uji pertama kali) sebanyak 9 ekor mencit yaitu 1 ekor mencit pada perlakuan dosis 4500 mg/kgBB, 1 ekor mencit pada perlakuan dosis 5500 mg/kgBB, 3 ekor mencit pada perlakuan dosis 6500 mg/kgBB, dan 4 ekor mencit pada perlakuan 7500 mg/kgBB. Pada hari ke-2 terdapat 8 ekor mencit yang mati setelah pemberian sediaan uji yaitu 2 ekor mencit pada perlakuan dosis 4500 mg/kgBB, 3 ekor mencit pada perlakuan dosis 5500 mg/kgBB, 2 ekor mencit pada perlakuan dosis 6500 mg/kgBB, dan 1 ekor mencit pada perlakuan dosis 7500 mg/kgBB. Kematian mencit terakhir terjadi pada hari ke-3 yaitu 2 ekor mencit pada perlakuan dosis 4500 mg/kgBB dan 1 ekor mencit pada perlakuan 5500 mg/kgBB setelah pemberian sediaan uji. Mencit pada kelompok kontrol yang diberi aquadest dapat bertahan hingga hari ke-28.

Gambaran histopatologi hepar mencit yang mengalami kelainan setelah diberi perlakuan yang menyebabkan kematian (Gambar 1).



Gambar 1 Histopatologi hepar mencit. (a) Normal, (b) Degenerasi parenkimatosia terjadi pembengkakan sel, (c) Degenerasi hidropik terjadi penimbunan intraseluler, (d) Nekrosis

Analisis Data Uji Toksisitas Subakut

Statistika deskriptif yaitu suatu metode yang berkaitan dengan pengumpulan dan pendeskripsian data untuk memperoleh informasi yang dibutuhkan. Hasil analisis deskriptif uji toksisitas sub-akut pada setiap kelompok perlakuan disajikan dalam Tabel 2.

Tabel 2. Analisis deskriptif uji toksisitas subakut

Kelompok	Mean	N	Std. Deviation
K	1,2	5	0,45
P ₁	1,4	5	0,55
P ₂	1,8	5	0,45
P ₃	2,2	5	0,45
P ₄	3,6	5	0,55

Berdasarkan Tabel 2, diketahui kelompok P₄ memiliki rerata tinggi dibandingkan rerata kelompok perlakuan yang lain. Sedangkan untuk standar deviasi kelompok P₁ dan P₄ memiliki standar deviasi yang sama dan tertinggi dibandingkan standar deviasi kelompok perlakuan lain. Ini artinya varians data pada kelompok P₁ dan P₄ lebih bervariasi atau beragam.

Hasil Uji Beda Nonparametrik *Kruskal Wallis*

Uji *Kruskal Wallis* sebagai prosedur alternatif dari *One Way Anova* dan menggunakan *mean rank* dalam analisisnya dikarenakan data yang didapatkan tidak berdistribusi normal walaupun datanya homogen.

Tabel 3. Rank uji *Kruskall-Wallis*

Kelompok	Rata-rata Rank
K	6,50
P ₁	8,50
P ₂	12,50
P ₃	14,50
P ₄	23,00

Dari Tabel 3, dapat diketahui bahwa kelompok K merupakan kelompok dengan nilai skor paling kecil dan kelompok P₄ merupakan kelompok dengan nilai skor paling besar dibandingkan dengan kelompok lainnya.

Tabel 4. Hasil uji *Kruskall-Wallis*

Kruskal Wallis Test	Data
Chi-Square	17,650
df	4
ρ -value	0,001

Keterangan :

df: Derajat bebas atau *degree of freedom* ρ : Nilai probabilitas

Berdasarkan hasil uji *Kruskal Wallis* pada tabel di atas, diketahui nilai probabilitas sebesar 0,001 yang mana nilai probabilitas ini lebih kecil dibandingkan tingkat signifikansi 0,05. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan skor yang signifikan antar kelompok perlakuan atau pemberian ekstrak biji kakao (*Theobroma cacao L.*) dengan dosis 4500 mg/kgBB, 5500 mg/kgBB, 6500 mg/kgBB, dan 7500 mg/kgBB berpengaruh terhadap toksisitas subakut pada hepar mencit.

Hasil Uji Beda Nonparametrik *Mann-Whitney*

Pengujian perbedaan antar kelompok secara berpasangan dilakukan menggunakan uji beda non-parametrik *Mann-Whitney* yang menggunakan *mean rank* dan *sum of rank* dalam analisisnya. Tidak seperti uji beda non-parametrik *Kruskal-Wallis*, uji *Mann-Whitney* hanya bisa mengakomodir atau menguji perbedaan antar dua kelompok.

Tabel 5. Hasil uji *Mann-Whitney*

Pasangan Kelompok		Skor	
Kelompok I	Kelompok II	Beda Rerata	Signifikansi
K	P1	-0,2	0,513
K	P2	-0,6	0,072
K	P3	-0,8	0,015
K	P4	-2,4	0,006
P1	P2	-0,4	0,221
P1	P3	-0,6	0,042
P1	P4	-2,2	0,007
P2	P3	-0,2	0,180
P2	P4	-1,8	0,006
P3	P4	-1,6	0,005

Tabel 5 menunjukkan bahwa terdapat 6 pasang kelompok yang memiliki nilai ρ pada uji *Mann-Whitney* kurang dari 0,05 (ρ -value < 0,05) yaitu kelompok K dan P3, K dan P4, P1 dan P3, P1 dan P4, P2 dan P4, P3 dan P4. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan skor toksisitas subakut yang signifikan antara kelompok tersebut atau pemberian ekstrak biji kakao (*Theobroma*

cacao L.) dengan dosis 4500 mg/kgBB, 5500 mg/kgBB, 6500 mg/kgBB, dan 7500 mg/kgBB berpengaruh terhadap toksisitas subakut pada hepar mencit. Pasangan kelompok K dan P1, K dan P2, P1 dan P2, P2 dan P3 memiliki nilai ρ pada uji *Mann-Whitney* lebih dari 0,05 (ρ -value > 0,05). Hal tersebut menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan skor toksisitas subakut yang signifikan antara kelompok-kelompok tersebut.

Hasil penelitian ini memberikan data angka kematian mencit selama periode pemberian sediaan uji, skor kerusakan hepar mencit akibat pemberian sediaan uji ekstrak biji kakao dengan dosis bertingkat. Mencit diaklimatisasi terlebih dahulu selama satu minggu sebelum diberikan perlakuan agar mencit dapat beradaptasi dengan suasana laboratorium, menghilangkan stres akibat transportasi, serta ditimbang terlebih dahulu untuk mengetahui berat badan mencit sebelum diberi perlakuan. Mencit yang digunakan dalam penelitian ini memiliki berat badan 20-30gram dan berusia 2-3 bulan.

Uji skrining fitokimia digunakan untuk mengidentifikasi kandungan senyawa yang terdapat pada ekstrak biji kakao memperlihatkan adanya kandungan senyawa aktif yaitu flavonoid dan kuinon. Penelitian sebelumnya terdapat perbedaan selain ditemukan senyawa flavonoid dan kuinon juga ditemukan senyawa alkaloid, tanin, saponin, dan triterpenoid.⁵ Perbedaan hasil dapat terjadi akibat beberapa faktor, seperti faktor geografis tempat tanaman kakao tumbuh yang mana tempat atau lingkungan berpengaruh terhadap proses fotosintesis dan kandungan fitokimia, jenis kakao, perawatan tanaman kakao serta jenis uji fitokimia yang digunakan.

Flavonoid merupakan metabolit sekunder dari polifenol yang larut dalam air. Flavonoid terdapat pada semua tumbuhan hijau salah satunya tumbuhan kakao sehingga dapat ditemukan pada setiap ekstrak tumbuhan. Bioaktif flavonoid dianggap sebagai fitokimia terpenting dalam makanan yang memiliki manfaat biologis bagi manusia termasuk anti-virus, anti-inflamasi, kardioprotektif, anti-diabetes, anti kanker, melindungi struktur sel, dan antioksidan yang menghambat terjadinya proses oksidasi yang dipicu oleh radikal bebas dari senyawa toksik.¹⁶

Kuinon merupakan salah satu turunan senyawa fenol yang menunjukkan aktivitas biologis dan farmakologis diantaranya sebagai antijamur, antimalaria, antibakteri, antikanker dan antioksidan.¹⁷ Kuinon merupakan senyawa berwarna dan mempunyai kromofor dasar seperti kromofor pada benzokuinon, yang terdiri atas dua gugus karbonil yang berkonjugasi dengan dua ikatan rangkap karbon-karbon. Warna pigmen kuinon di alam beragam mulai dari kuning pucat sampai kehitaman. Senyawa antrakuinon dan kuinon mempunyai kemampuan sebagai anti biotik dan penghilang rasa sakit serta merangsang pertumbuhan sel baru pada kulit.¹⁸

Organ yang menjadi sasaran pada penelitian ini adalah hepar karena hepar terlibat dalam metabolisme zat makanan serta sebagian besar obat dan toksikan.¹⁹ Meskipun hepar memiliki aktivitas enzim yang dapat melakukan metabolisme merubah toksikan menjadi kurang toksik, namun apabila kadar toksikan terlalu tinggi maka dapat menyebabkan kerusakan maupun kematian sel-sel hepar itu sendiri. Efek toksik segera terjadi setelah senyawa toksik mencapai hepar dan ginjal pada konsentrasi yang tinggi.²⁰ Apabila hepar terus menerus terpapar obat dan zat kimia dalam jangka waktu yang panjang, maka sel-sel pada hepar akan mengalami perubahan seperti degenerasi parenkimatos, degenerasi hidropik, dan nekrosis.

Sel yang mengalami cedera kemudian mengalami robekan pada membran plasma dan perubahan inti sel sehingga menyebabkan terjadinya kematian sel atau nekrosis. Nekrosis merupakan kematian sel atau jaringan pada organisme hidup yang bersifat irreversible. Kematian sel ini terjadi melalui proses apoptosis dan nekrosis sel. Apoptosis merupakan proses kematian sel yang terencana, sedangkan nekrosis tidak.²¹

Keseluruhan sampel mencit pada kelompok kontrol yang diberi akuades dapat bertahan hingga 28 hari dan hasil pengamatan histopatologi hepar berada pada kondisi normal. Pada perlakuan P1 (ekstrak biji kakao dosis 4500 mg/kgBB) yang mana sampel mencit hanya bertahan selama 3 hari memperlihatkan kondisi hepar yang cenderung normal dan degenerasi parenkimatos. Kematian mencit dengan kondisi hepar normal dapat disebabkan karena beberapa faktor seperti kondisi mencit

yang mengalami stress, pengaruh zat atau penyakit lain pada mencit, kanibalisme antar sesama, serta faktor internal lain seperti daya tahan tubuh dan kerentanan mencit. Pada perlakuan P2 (ekstrak biji kakao dosis 5500 mg/kgBB) sampel mencit hanya bertahan selama 3 hari dan cenderung mengalami degenerasi parenkimatos. Pada perlakuan P3 (ekstrak biji kakao dosis 6500 mg/kgBB) mencit hanya bertahan selama 2 hari dan cenderung berada pada kondisi degenerasi parenkimatos. Pada kelompok perlakuan P4 (ekstrak biji kakao dosis 7500 mg/kgBB) mencit hanya bertahan selama 2 hari dan cenderung berada pada pada kondisi degenerasi hidropik dan nekrosis.

Kematian mencit yang cepat dan kerusakan hepar yang parah dapat disebabkan karena sebelum pengambilan sampel tidak dilakukan pemeriksaan terhadap hepar mencit, sehingga terdapat kemungkinan ketika mencit diambil sebagai sampel telah mengalami kerusakan sebelumnya. Selain itu dapat disebabkan karena pemberian dosis yang terlalu besar yang dapat merusak sel hepar sehingga hepar tidak kuat menahan beban yang diterima. Kenaikan dosis sangat berpengaruh karena menyebabkan lebih banyak sistem organ yang terkena dan menunjukkan efek kerja yang lebih cepat. Setelah dosis berada pada dosis toksik, maka zat tersebut dapat menimbulkan keracunan hingga kematian.²²

Ketika mencit diberi ekstrak biji kakao dengan dosis yang semakin tinggi maka akan mempercepat kerusakan pada sel sehingga mempercepat kematian pada mencit. Kandungan kuinon pada biji kakao juga dapat menyebabkan efek samping sulit bernafas dan jika terpapar kuinon dalam dosis tinggi dan waktu yang cukup lama bukan merupakan antioksidan yang baik karena dapat menimbulkan efek samping berupa peradangan sampai kerusakan hepar dan meningkatkan risiko penyakit karsinogenesis pada hewan coba. Skor kerusakan hepar yang terjadi dibuatkan tabel skoring.

Pengujian data menggunakan uji *Kruskal Wallis* menunjukkan nilai probabilitas lebih kecil dibandingkan tingkat signifikansi 0,05. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan skor yang signifikan antar kelompok perlakuan. Hasil Uji *Mann Whitney* menunjukkan bahwa

tidak terdapat perbedaan skor toksisitas subakut yang signifikan antara kelompok-kelompok tersebut.

Dari hasil penelitian di atas dapat dikatakan bahwa pemberian ekstrak biji kakao (*Theobroma cacao L.*) pada uji toksisitas subakut selama 28 hari memiliki resiko toksik terhadap mencit (*Mus musculus*) dan berpengaruh terhadap toksisitas subakut yang terjadi pada hepar mencit.

SIMPULAN

Pemberian ekstrak biji kakao pada dosis 4500 mg/kgBB, 5500 mg/kgBB, 6500 mg/kgBB, dan 7500 mg/kgBB berpengaruh terhadap toksisitas subakut dan histopatologi hepar mencit sehingga menyebabkan kematian pada mencit.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan untuk Ni Putu Santhi Utami Dewi yang sudah membantu dan memberikan kontribusi pada penulis.

DAFTAR PUSTAKA

1. Hardiyanti. Pemanfaatan tumbuhan sebagai obat tradisional oleh masyarakat di desa sumillan kecamatan alla' kabupaten enrekang. Skripsi. Makassar: Universitas Muhammadiyah; 2021.
2. Putri HE. Uji toksisitas akut ekstrak etanol daun bidara (*Ziziphus spina-christi L.*) terhadap gambaran morfologi dan histologi hati mencit (*Mus musculus*) jantan. Skripsi. Makassar: Universitas Islam Negeri Alauddin; 2016.
3. Rukmana HR, Yudirachman, Herdi H. Untung Selangit dari Agribisnis Kakao. Yogyakarta: Lily Publisher; 2016.
4. Etherton PK, Keen CL. Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. *Lipidology* 2022; 2(13):41-49. Doi: [10.1097/00041433-200202000-00007](https://doi.org/10.1097/00041433-200202000-00007)
5. Kayaputri IL. Kajian fitokimia ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao L.*). *Chimica et Natura Acta* 2014; 2(1): 83-90.

6. Ardian P. Analisa Ekstraktif Tumbuhan Sebagai Sumber Bahan Obat. Padang: Pusat Penelitian Universitas Negeri Andalas; 2015.
7. Lingga, Lanny. Healthy secret of pepper (cabai). Jakarta: Elex Media Komputindo; 2012.
8. Sastyarina Y. Uji toksisitas akut dan subakut pada pemberian ekstrak etanol bawang tiwai (*Eleutherine americana merr.*). *J. Trop. Pharm. Chem* 2013; 2(2):118-124. Doi: <https://doi.org/10.25026/jtpc.v2i2.57>
9. Hafizha, Suardita K, Pribadi N. Daya antibakteri ekstrak batang pisang ambon (*Musa paradisiaca var. sapientum*) terhadap pertumbuhan *Enterococcus faecalis*. *Conservative Dentistry Journal* 2018;8(2):85-90.
10. Dewoto HR. Pengembangan obat tradisional Indonesia menjadi fitofarmaka. *Majalah Kedokteran* 2007;57(8):57.
11. Dhuha NS, Haeria H, Putri HE. Toksisitas akut ekstrak etanol daun bidara (*Ziziphus spina-christi L.*) berdasarkan gambaran morfologi dan histologi hati mencit. *Ad-Dawaa' Journal of Pharmaceutical Sciences* 2016;2(1):46-47.
12. Dianti PPP. Pengaruh konsentrasi ekstrak biji kakao (*Theobroma cacao L.*) terhadap jumlah sel fibroblas pada penyembuhan luka insisi gingiva marmut jantan (*Cavia porcellus*). Skripsi. Denpasar: Universitas Mahasaraswati; 2020.
13. Al-Fa'izah Z. Efektivitas gel ekstrak biji kakao (*Theobroma cacao L.*) terhadap jumlah sel fibroblast pada soket pasca pencabutan gigi tikus wistar jantan. Skripsi. Jember: Universitas Jember; 2018.
14. Ali MF. 2018. Efek ekstrak biji kakao (*Theobroma cacao L.*) terhadap re-epitelialisasi soket pasca pencabutan gigi tikus wistar. Skripsi. Jember: Universitas Jember; 2018.
15. Suardita IW, Mufida DC, Misnawi. Efek Imunomodulasi Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cacao L.*) terhadap Aktivitas dan Kapasitas Fagositosis Sel Makrofag Peritoneum Mencit yang Diinfeksi Bakteri *Staphylococcus epidermidis*. Repository Unej 2014. Available at: <http://repository.unej.ac.id/bitstream/handle/123456789/59369/I%20Waya>. [Accessed 20 April 2022]

16. Arifin B, Ibrahim S. Struktur, bioaktivitas dan antioksidan flavonoid. *Jurnal Zarah* 2018;6(1):21-29. Doi: <https://doi.org/10.31629/zarah.v6i1.313>
17. Mutrikah, Santoso H, Syauqi A. Profil bioaktif pada tanaman temulawak (*curcuma xanthorrhiza roxb*) dan beluntas (*pluchea indica less*). *Biosaintropis (Bioscience-Tropic)* 2018;4(1):15-21.
18. Noer S. Pratiwi RD. Uji kualitatif fitokimia daun ruta *angustifolia*. *Faktor Exacta* 2016;9(3):200-206.
19. Lu FC. *Toksikologi Dasar : Asas, Organ, Sasaran, dan Penilaian Resiko*. 2 ed. Jakarta: UI Press; 2010.
20. Huda MN, Holiday D, Fajrin FA. Uji toksisitas subkronik jamu asam urat pada hati mencit galur balb-c. *e-Jurnal Pustaka Kesehatan* 2017;5(1): 65-70. Doi: <https://doi.org/10.19184/pk.v5i1.3952>
21. Oktarian A, Budiman H, Aliza D. Histopatologi hati tikus putih (*rattus norvegicus*) yang diinjeksi formalin (histopathology of rat (*rattus norvegicus*) liver induced by formaldehyde. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Veteriner* 2017;1(3):316-323.
22. Wirasuta IMAG, Niruri R. *Toksikologi umum*. Bali:Universitas Udayana; 2006