

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL COKLAT HITAM  
(*Theobroma cacao* L.) DALAM MENGHAMBAT PENINGKATAN  
KADAR MALONDIALDEHYDE (MDA) OTOT  
GASTROKNEMIUS SETELAH TREADMILL RUNNING TEST  
PADA TIKUS WISTAR JANTAN**

Veghanasanah Tanlie\*, Sugiarto Puradisastra\*\*,  
Pinandjojo Djojosewarno\*\*

\*Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Maranatha, Bandung

\*\*Bagian Farmakologi Fakultas kedokteran Universitas Kristen Maranatha, Bandung

\*\*\*Bagian Fisiologi Fakultas kedokteran Universitas Kristen Maranatha, Bandung

\*\*\*\*Bagian Farmakologi dan Terapi Fakultas Kedokteran Universitas Padjajaran , Bandung

**ABSTRAK**

Latihan fisik secara teratur dapat mencegah obesitas, penyumbatan pembuluh darah, penyakit jantung koroner, osteoporosis. Latihan fisik yang berat dan berlebihan dapat menimbulkan kerusakan oksidatif dalam sel-sel tubuh, sehingga tubuh membutuhkan suplai antioksidan dari luar seperti coklat hitam (*Theobroma cacao*.L) mengandung polifenol yang tinggi.

**Tujuan penelitian** ini adalah untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol coklat hitam dalam menghambat peningkatan kadar MDA (*Malondialdehyde*) otot gastroknemius tikus Wistar Jantan setelah *Treadmill Running Test*.

**Desain penelitian** menggunakan eksperimental laboratorik. Tikus Wistar jantan sebanyak 24 ekor dikelompokkan secara acak menjadi empat kelompok (n = 6) EECH dengan dosis 1,11 g/KgBB, 2,22 g/KgBB, 4,44 g/KgBB dan CMC 1% 2 ml selama 18 hari. Uji *treadmill* dilakukan satu kali sehari pada hari ke-14 sampai ke-18 (kecepatan 15 m/menit, setiap dua menit ditingkatkan satu meter/menit, kemiringan 15°) sampai kelelahan. Data yang diukur adalah kadar MDA otot gastroknemius kanan pada hari ke - 18 dalam satuan mol/ml dan jarak tempuh dalam meter. Analisis data rasio kadar MDA terhadap jarak tempuh menggunakan Kruskal Wallis. Jika bermakna, dilanjutkan dengan Mann-Whitney U.

**Hasil** menunjukkan rasio kadar MDA terhadap jarak tempuh pada kelompok EECH 1 (17,686), EECH 2 (10,2331) dan EECH 3 (5,6084) dibandingkan dengan kontrol CMC 1% (17,0968) tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan  $p = 0,200$ .

Simpulan adalah Ekstrak etanol coklat hitam menghambat peningkatan kadar MDA dalam otot gastroknemius tikus Wistar Jantan setelah *Treadmill Running Test*.

Kata kunci: *Theobroma cacao* L., *Malondialdehyde*, *treadmill*, ekstrak etanol

**ABSTRACT**

*Regular physical exercise can prevent obesity, clogged arteries, coronary heart disease, osteoporosis. Excessive physical exercise can cause oxidative damage to body cells, so the body needs antioxidant supplies from outside the body such as dark chocolate (*Theobroma cacao*.L) that contains high polyphenols.*

*The purpose of this research was to assess the effect of ethanol extract of dark chocolate (*Theobroma cacao* L.) on inhibit the increase Malondialdehyde (MDA) levels of gastrocnemius muscle after treadmill running test on male wistar rats.*

The research design was using laboratory experimental design. A total of 24 male Wistar rats were randomly divided into four EECH groups ( $n=6$ ), in the dose of 1.11 g/kgBW, 2.22 g/kgBW, 4.44 g/KgBW, and CMC 1% for 18 days. Treadmill test was done once a day from day 14 to 18 (speed 15m/min, increased 1 m/min, every two minutes, 15° slope) until exhaustion. The measurements of data were MDA levels of right gastrocnemius muscle on day-18 units of mol/ml and the distance in meters. Data was analyzed ratio MDA levels and distances using Kruskal-Wallis. Significant result, then analyzed by Mann-Whitney U.

The results showed MDA levels ratio to the distance of group EECH 1 (17,686), EECH 2 (10,2331) and EECH 3 (5,6084) compared to control CMC 1% (17,0968) showed no significant difference with  $p = 0.200$ .

The conclusion is ethanol extract of dark chocolate inhibits the increase of MDA levels of gastrocnemius muscle after treadmill running test on male wistar rats.

**Keywords :** *Theobroma cacao L., Malondialdehyde, treadmill, ethanol extract.*

## PENDAHULUAN

Latihan fisik secara teratur mempunyai efek yang baik terutama mencegah obesitas, penyumbatan pembuluh darah, penyakit jantung koroner, dan osteoporosis.<sup>8</sup> Latihan fisik dapat berupa berjalan, bersepeda, berlari, berenang, dan olahraga lain.<sup>1</sup> Tetapi latihan fisik yang berat dan berlebihan pada individu yang tidak terkontrol dapat menimbulkan kerusakan oksidatif dalam sel-sel tubuh. Kerusakan oksidatif adalah kerusakan biomolekuler sel-sel jaringan tubuh akibat radikal bebas. Kerusakan pada biomolekul tersebut menyebabkan perubahan pada sel berupa degenerasi, penuaan ataupun kematian sel.<sup>7</sup>

Manfaat latihan fisik akan hilang bila latihan fisik dilakukan sampai kelelahan. Latihan fisik maksimal yang melelahkan, terutama bila dilakukan sesekali, dapat menyebabkan kerusakan struktur atau reaksi inflamasi pada otot. Sebagian kerusakan ini, berhubungan dengan oksidan / radikal bebas yang dihasilkan selama latihan fisik.<sup>8</sup>

Kini coklat dikenal di seluruh dunia dan coklat juga mempunyai

sifat anti platelet yang berkaitan dengan perlindungan pada penyakit jantung, memodulasi sistem imun, anti inflamasi, dan anti kanker.<sup>5</sup> Coklat mempunyai sifat antioksidan dan antiradikal karena mengandung polifenol terutama proisianidin dan flavonoid. Senyawa fenolik dari coklat merupakan senyawa bioaktif, terutama menonjol pada efek metabolik dan kardiovaskular. Senyawa ini akan meningkatkan antioksidan dalam plasma dan otot. Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa kandungan anti oksidan di dalam coklat hitam empat kali lebih banyak dari pada teh hijau dan dua kali lebih banyak dari pada *red wine*.<sup>6</sup>

*Malondialdehyde* merupakan salah satu penanda yang sering digunakan dalam mendeteksi *lipid peroxidation*. Selain itu juga MDA terbentuk selama biosintesis prostaglandin. MDA dapat ditemukan dalam tubuh seperti pada otot dan plasma darah.<sup>4</sup> Coklat Hitam diharapkan mampu menghambat peningkatan kadar MDA.

## TUJUAN PENELITIAN

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek ekstrak

etanol coklat hitam terhadap kadar MDA otot gastroknemius tikus Wistar Jantan setelah *Treadmill Running Test*.

## BAHAN/ SUBJEK DAN METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental laboratorik. Hewan coba yang digunakan adalah tikus Wistar jantan berusia 8-10 minggu sebanyak 60 ekor pada penelitian awal dan setelah diseleksi menjadi 24 ekor untuk penelitian lanjutan. Hewan coba kemudian dibagi menjadi empat kelompok secara acak dan masing-masing kelompok terdiri atas enam ekor tikus. Perlakuan yang diberikan sesuai dengan kelompok yang telah ditentukan dan satu kelompok tanpa perlakuan sebagai kontrol. Ekstrak etanol coklat hitam (EECH) diberikan per oral menggunakan sonde. Data yang diukur adalah kadar MDA otot gastroknemius kanan dalam mol/ml dan jarak tempuh dalam meter.

Analisis data rasio kadar MDA terhadap jarak tempuh dianalisis normalitasnya menggunakan uji *Kolmogorov - smirnov*, bila distribusi normal dilakukan uji ANAVA satu arah bila data terdistribusi tidak normal dilakukan uji non parametrik Kruskal-Wallis dilanjutkan Mann Whitney U dengan  $\alpha = 0,05$  dan dilanjutkan uji LSD dengan tingkat kepercayaan 95% dan tingkat kemaknaan berdasarkan nilai  $p < 0,05$ .

### Penelitian awal

Tikus sebanyak 60 ekor diseleksi kemampuan berlari pada *treadmill* dengan kecepatan 15 m/menit selama 5 menit. Seleksi tikus dilakukan sebanyak 3 kali sampai didapatkan sebanyak 24 ekor.

### Penelitian lanjutan

Tikus dikelompokkan secara acak menjadi 4 kelompok ( $n=6$ ) dan dilakukan pengenalan terhadap *treadmill* selama 5 hari. Kemudian masing-masing kelompok diberi perlakuan dengan volume 2 ml secara oral selama 18 hari yaitu, kelompok EECH I diberi dosis 1,11 g/KgBB, kelompok EECH 2 diberi dosis 2,22 g/KgBB, kelompok EECH 3 diberi dosis 4,44 g/KgBB. EECH 1, 2, dan 3 dilarutkan dalam CMC 1%, dan kelompok IV diberi CMC 1%. Pada hari ke-14 sampai ke-18, empat puluh lima menit setelah diberi perlakuan, dilakukan *treadmill running test* sampai tikus kelelahan. *Treadmill machine* diatur dengan kecepatan 15 m/menit, setiap 2 menit ditingkatkan 1 m/menit. Dicatat waktu (menit) dan kecepatan (meter/menit) selama tikus berlari di atas *treadmill* untuk menghitung jarak tempuh. Jaringan otot gastroknemius diseksi dan ditimbang 0,5 gr. Setelah itu ukur kadar MDA dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 532 nm.

### Bahan :

- Coklat hitam (*Theobroma cacao* L.)
- *Carboxymethyl Cellulose* (CMC) 1%
- Akuades
- Pakan mencit
- NaCl 0.9%
- Batu Es
- 2-Thiobarbiturat acid
- Standar MDA
- *Acetic acid glacial*
- *Sodium hydroxide* (NaOH)

### Alat :

- *Treadmill machine*
- Kandang mencit
- Sonde oral untuk mencit

- Pipet
- Timbangan
- Mortar
- *Dissecting set*
- *Elisa Kit*
- *Sprit 5 ml*
- Sentrifugal
- Spektrofotometri

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel 1 Kadar *MDA* dalam mmol dan Jarak Tempuh Dalam Meter

Mencit/ Kelompok	EECH 1		EECH 2		EECH 3		Kontrol	
	<i>MDA</i>	Jarak	<i>MDA</i>	Jarak	<i>MDA</i>	Jarak	<i>MDA</i>	Jarak
1	3491,44	670,05	6332,75	762,53	1926,31	161,5	2672,76	189,37
2	6188,28	140,4	5080,65	1343,57	3684,07	1050,38	2961,71	45,33
3	2504,21	219	4815,78	1132,27	2094,86	527,92	2070,79	1046,25
4	3780,9	507,5	4526,83	835,2	1830,00	239,67	1516,97	260,05
5	3491,44	117	2046,71	1324,87	1854,08	549,17	1324,34	215,33
6	1516,97	187,15	4984,33	1209,45	1228,02	379,5	2576,44	281,05
Rerata	3495,455	306,79	4631,175	1,101,315	2101,39	484,69	2187,168	339,563

Keterangan :

EECH 1 adalah kelompok ekstrak etanol coklat hitam (EECH) dosis 1,11 g/KgBB

EECH 2 adalah kelompok ekstrak etanol coklat hitam (EECH) dosis 2,22 g/KgBB

EECH 3 adalah kelompok ekstrak etanol coklat hitam (EECH) dosis 4,44 g/KgBB

Kontrol adalah kelompok larutan CMC 1%

Tabel 2 menunjukkan *MDA* dari tikus setiap kelompok bervariasi antara 1128,02 mmol pada kelompok EECH 3 sampai 6332,75 mmol pada kelompok EECH 2. Rerata jarak tempuh dari tikus di setiap kelompok bervariasi antara 45,33 m pada kelompok kontrol sampai 1343,57 m pada kelompok EECH 2. Kelompok EECH 2 mempunyai jarak tempuh yang lebih panjang dibandingkan dengan kelompok lain. Untuk melihat efektivitas ekstrak etanol coklat dalam menurunkan kadar radikal bebas selama menempuh jarak tersebut, maka dihitung rasio kadar *MDA* dibandingkan terhadap jarak tempuh.

Tabel 2 Perbandingan Rasio kadar *MDA* dengan jarak tempuh

Mencit/Kelompok	EECH 1	EECH 2	EECH 3	Kontrol
1	5,21	8,30	11,93	14,11
2	44,08	37,75	3,51	65,34
3	11,43	4,25	3,97	1,98
4	7,45	5,42	7,64	5,83
5	29,84	1,54	3,38	6,15
6	8,11	4,12	3,24	9,17
Rerata	17,686	10,2331	5,6084	17,0968

Tabel 2 menunjukkan rasio kadar radikal bebas (*MDA*) dengan jarak tempuh bervariasi antara 1,98 pada kelompok kontrol sampai 44,08 pada kelompok EECH 1.

## DISKUSI

Radikal bebas terbentuk seiring meningkatnya latihan fisik yang dilakukan. Radikal bebas yang terbentuk dapat merusak komponen seluler di dalam tubuh seperti merusak sel, materi genetik DNA dan RNA, dan berbagai penyakit degeneratif. Untuk menurunkan pembentukan radikal bebas digunakan antioksidan. Polifenol yang ada di coklat hitam merupakan salah satu contoh antioksidan dan mempunyai zat utama katekin guna mengimbangi peningkatan radikal bebas untuk menunda kelelahan sehingga radikal bebas terbentuk menurun dan terjadi peningkatan latihan fisik yang diinginkan.<sup>2</sup>

Pada penelitian dengan menggunakan ekstrak teh hijau juga didapatkan peningkatan jarak tempuh seiring dengan peningkatan lipid peroksidasi.<sup>3</sup> Hal ini berarti jarak tempuh meningkat dan radikal bebas meningkat. sehingga dapat disimpulkan bahwa teh hijau mempunyai potensi yang kurang dalam menghambat kadar radikal bebas. Peningkatan radikal bebas ini disebabkan katabolisme dari lemak dan karbohidrat sebagai sumber yang digunakan selama latihan fisik. Metabolisme lemak pada saat latihan fisik dipercaya merupakan kunci utama peningkatan kadar lipid peroksidasi di dalam otot. Katekin yang terdapat pada teh dan coklat juga diketahui mempunyai peranan yang sinergis terhadap peningkatan metabolisme lemak sehingga latihan fisik dapat dilakukan lebih lama dan juga radikal bebas yang terbentuk juga lebih banyak, namun kemungkinan kadar katekin pada coklat lebih tinggi dari pada teh hijau.<sup>3</sup>

Uji Normalitas Kormogorov - Smirnov dilakukan untuk mengetahui normalitas data. Hasil Uji normalitas didapatkan  $p = 0,02$ . Hal ini berarti data tidak terdistribusi normal, sehingga tidak memenuhi syarat untuk dilakukan pengujian parametrik ANAVA satu arah. Pengujian dilakukan dengan uji Kruskal-Wallis untuk melihat adanya perbedaan secara statistik dan didapatkan  $p > 0,05$ . Hal ini menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan sehingga tidak dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney U.

Rasio kadar MDA terhadap jarak tempuh pada EECH 1 (17,6863 ) secara statistik didapatkan sama dengan kontrol (17,0968) dengan jarak tempuh yang hampir sama.

Rasio kadar MDA terhadap jarak tempuh pada EECH 2 (10,2331) dan EECH 3 (5,6084) secara statistik sama dengan kontrol, tetapi dengan rerata jarak tempuh yang berbeda yaitu pada EECH 2 (1101,315 m) dan EECH 3 (484,69 m ) dibandingkan kontrol (339,563 m). Hal ini berarti kelompok EECH 2 dan EECH 3 mampu menghambat pembentukan radikal bebas. Peningkatan jarak tempuh pada kelompok EECH 2 mungkin disebabkan aktivitas anti oksidan yang poten dan mampu menghambat peningkatan radikal bebas dan hal ini menyebabkan pembentukan asam laktat yang tertunda. Coklat mempunyai aktivitas anti oksidan yang sangat poten.<sup>6</sup> Coklat hitam mempunyai kadungan anti oksidan yaitu polifenol yang mampu memperlambat kelelahan otot.

Hipotesis penelitian adalah ekstrak etanol coklat hitam (*Theobroma cacao* L.) menghambat

peningkatan kadar *MDA* otot gastrocnemius tikus Wistar jantan setelah *treadmill running test*. Hal-hal yang mendukung adalah pada Uji Kruskal Wallis dari setiap kelompok tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan  $p = 0,2$ . Hal ini berarti ekstrak etanol coklat hitam dapat menghambat peningkatan kadar *MDA*. Sedangkan hal-hal yang tidak mendukung tidak ada. Oleh karena itu Hipotesis diterima dan teruji oleh data.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Global Recommendations on Physical Activity for Health. **WHO**. 2011.
2. Polyphenols in Cocoa. **Hii, C L**. 2009, Asian Journal of Food and Agro-Industry, pp. 1-21.
3. Green tea extract improves running endurance in mice by stimulating lipid utilization during exercise. **Murase, Takatoshi, et al**. Japan : s.n., January 05, 2006, Biological Science Laboratories, Kao Corporation, Tochigi, Japan.
4. **Winarsi, Hery**. Anti Oksidan Alami dan Radikal Bebas. Yogyakarta : Kanisius, 2007.
5. Cocoa Polyphenols and Their Potential Benefits for Human Health. **I. Andujar, M. C. Recio, R. M. Giner, and J. L. Rios**. 2012, Departament de Farmacologia, Facultat de Farm`acia, Universitat de Val`encia, Avenida Vicent Andr´es Estell´es s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain.
6. **Simadibrata, Marcellus**. Anti-free Radical Effects of Dark Chocolate in Radical Damage and Constipation. Jakarta : Department of Internal Medicine Faculty of Medicine, University of Indonesia , 2011.
7. Latihan Olahraga dan Radikal Bebas. **Djamil, Rusdan**. 2005, Laboratorium Fisiologi Sub Divisi Fisiologi Olahraga Fakultas Kedokteran Universitas Andalas.
8. Intense and exhaustive exercise induce oxidative stress in skeletal muscle. **Thirumalai, T., Therasa, S. V., Elumalai, E., and David, E**. 2011, Asian Pacific Journal of Tropical Disease, pp. 63-66.