

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK
VACCINIUM MACROCARPON AITON
TERHADAP AKTIVITAS SPESIFIK ENZIM
KATALASE JANTUNG DAN DARAH TIKUS
SPRAGUE DAWLEY SETELAH DIINDUKSI
HIPOKSIA**

SKRIPSI



disusun oleh

JONATHAN EDBERT AFANDY

405160200

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS TARUMANAGARA
JAKARTA**

2019

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK
VACCINIUM MACROCARPON AITON
TERHADAP AKTIVITAS SPESIFIK ENZIM
KATALASE JANTUNG DAN DARAH TIKUS
SPRAGUE DAWLEY SETELAH DIINDUKSI
HIPOKSIA**

SKRIPSI



diajukan sebagai salah satu prasyarat
untuk mencapai gelar Sarjana Kedokteran (S.Ked) pada
Fakultas Kedokteran Universitas Tarumanagara

JONATHAN EDBERT AFANDY

405160200

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS TARUMANAGARA**

JAKARTA

2019

PERNYATAAN ORISINALITAS KARYA ILMIAH

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Jonathan Edbert Afandy

NIM : 405160200

dengan ini menyatakan, menjamin bahwa proposal skripsi yang saya serahkan kepada Fakultas Kedokteran Universitas Tarumanagara berjudul:

“Pengaruh Pemberian Ekstrak *Vaccinium macrocarpon Aiton* terhadap Aktivitas Spesifik Enzim Katalase Jantung dan Darah Tikus *Sprague Dawley* setelah Diinduksi Hipoksia”

merupakan hasil karya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar dan tidak melanggar ketentuan plagiarisme dan otoplagiarisme.

Saya memahami dan akan menerima segala konsekuensi yang berlaku di lingkungan Universitas Tarumanagara apabila terbukti melakukan pelanggaran plagiarisme atau otoplagiarisme.

Pernyataan ini saya buat dengan penuh kesadaran dan tanpa paksaan dari pihak manapun.

Jakarta, 27Juni 2019

Penulis,

(Jonathan Edbert Afandy)

405160200

PENGESAHAN SKRIPSI

Skripsi yang diajukan oleh:

Nama : Jonathan Edbert Afandy

NIM : 405160200

Program Studi : Ilmu Kedokteran

Judul Skripsi :

Pengaruh Pemberian Ekstrak *Vaccinium macrocarpon Aiton* terhadap Aktivitas Spesifik Enzim Katalase Jantung dan Darah Tikus *Sprague Dawley* setelah Diinduksi Hipoksia

dinyatakan telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian prasyarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran (S.Ked) pada Program Studi Sarjana Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Tarumanagara.

Pembimbing : dr. Shirly Gunawan, Sp.FK ()

DEWAN PENGUJI

Ketua Sidang : Dr. dr. Siufui Hendrawan, M.Biomed ()

Penguji 1 : dr. Triyana Sari, M.Biomed ()

Penguji 2 : dr. Shirly Gunawan, Sp.FK ()

Mengetahui,

Dekan FK : Dr. dr. Meilani Kumala, MS., Sp.GK(K) ()

Ditetapkan di

Jakarta, 27 Juni 2019

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis haturkan kepada Tuhan Yang Maha Esa karena atas rahmatnya skripsi dengan judul “Pengaruh Pemberian Ekstrak *Vaccinium macrocarpon Aiton* terhadap Aktivitas Spesifik Enzim Katalase Jantung dan Darah Tikus *Sprague Dawley* setelah Diinduksi Hipoksia” dapat diselesaikan dengan baik. Skripsi ini adalah salah satu prasyarat untuk mencapai gelar Sarjana Kedokteran.

Selama proses penyusunan skripsi ini, penulis mendapatkan pengalaman dan pengetahuan baru yang berguna untuk kedepannya. Penulis juga menemui berbagai kendala dalam pelaksanaan penelitian ini, oleh karena itu penulis menyampaikan ucapan terima kasih atas bantuan dan dukungan dalam penyusunan skripsi ini kepada:

1. Dr. dr. Meilani Kumala, MS., Sp.GK(K) selaku Dekan dan Ketua Unit Penelitian dan Publikasi Ilmiah Fakultas Kedokteran Universitas Tarumanagara;
2. dr. Shirly Gunawan, Sp. FK selaku Dosen Pembimbing Skripsi;
3. Prof. Dr. dr. Frans Ferdinal, MS. selaku Kepala Bagian Biokimia dan Biologi Molekuler Universitas Tarumanagara;
4. dr. David Limanan, M. Biomed dan Ibu Eny Yulianti selaku Staf Bagian Biokimia dan Biologi Molekuler Universitas Tarumanagara;
5. Kedua orang tua dan keluarga yang memberi dukungan tanpa henti;
6. Teman-teman dan para sahabat, yang selalu membantu dan mendukung proses penyusunan skripsi.

Akhir kata, semoga skripsi ini dapat memberi dampak positif bagi kemajuan ilmu pengetahuan dan kesehatan masyarakat.

Jakarta, 27 Juni 2019

Penulis,

(Jonathan Edbert Afandy)

405160200

PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Jonathan Edbert Afandy

NIM : 405160200

Program Studi : Ilmu Kedokteran

Fakultas : Kedokteran

Karya Ilmiah : Skripsi

Demi pengembangan ilmu dan pengetahuan, menyetujui untuk memublikasikan karya ilmiah berjudul:

Pengaruh Pemberian Ekstrak *Vaccinium macrocarpon Aiton* terhadap Aktivitas Spesifik Enzim Katalase Jantung dan Darah Tikus *Sprague Dawley* setelah Diinduksi Hipoksia

dengan menyantumkan Fakultas Kedokteran Universitas Tarumanagara

Jakarta, 27 Juni 2019

Penulis,

(Jonathan Edbert Afandy)

405160200

ABSTRAK

Hipoksia adalah kondisi dimana kadar oksigen tidak berada oksigen tidak berada dalam level yang fisiologis. Kondisi tersebut menyebabkan peningkatan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang dapat merusak organ salah satunya jantung. Kerusakan akibat ROS dapat dicegah dengan antioksidan, baik endogen seperti katalase, maupun eksogen seperti buah kranberi. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui efek pemberian ekstrak buah kranberi (*Vaccinium macrocarpon Aiton*) terhadap aktivitas spesifik katalase pada jantung dan darah tikus yang telah diinduksi hipoksia sistemik kronik. Penelitian ini menggunakan desain eksperimental dan dilakukan secara *in vitro* yang meliputi uji fitokimia, kapasitas total antioksidan (Blois), kadar fenolik total (Singleton & Rossi), kadar alkaloid total (Trivedi, dkk.), dan toksisitas (Meyer), serta *in vivo* yang terdiri dari aktivitas spesifik katalase (Maté), dan pemeriksaan patologi anatomi. Sampel dalam penelitian ini adalah 32 ekor tikus *Sprague Dawley* yang dibagi ke dalam dua kelompok, uji (diberi ekstrak buah kranberi) dan kontrol. Masing-masing kelompok dibagi lagi kedalam empat subkelompok (normoksia, hipoksia 1, 7, dan 14 hari). Hasil uji didapatkan ekstrak buah kranberi mengandung *alkaloid* (66.118 µg/mL), *phenols* (351.64 µg/mL), *anthocyanin*, *betacyanin*, *cardio glycosides*, *coumarins*, *flavonoids*, *glycosides*, *quinones*, *steroids*, *terpenoids*, dan *tannins*, kapasitas total antioksidan IC₅₀ 49.760 µg/mL, dan nilai toksisitas LC₅₀ 153.081 µg/mL. Terjadi penurunan aktivitas spesifik katalase seiring bertambah lamanya perlakuan hipoksia, aktivitas spesifik katalase kelompok uji lebih tinggi dari kelompok kontrol, dan terdapat hubungan yang sangat kuat antara aktivitas spesifik katalase pada jantung dan darah. Gambaran patologi anatomi jantung tikus kelompok uji terlihat kerusakan yang lebih ringan dibandingkan kelompok kontrol.

Kata kunci: stres oksidatif, *Vaccinium macrocarpon Aiton*, katalase, jantung, darah

ABSTRACT

*Hypoxia is a condition where oxygen levels aren't at physiological level. That condition cause increase production of Reactive Oxygen Species (ROS) which can damage organs such as heart. Damage caused by ROS can be prevented by endogenous antioxidant e.g. catalase and exogenous antioxidant e.g. cranberry. The purpose of this study was to determine the effect of giving cranberry extract (*Vaccinium macrocarpon* Aiton) to catalase specific activity on the heart and blood of rats that had been induced by chronic systemic hypoxia. This study used experimental design and carried out in vitro which consists of phytochemical screening, total antioxidant capacity (Blois), total phenolic contents (Singleton & Rossi), total alkaloid contents (Trivedi, et al.), and toxicity (Meyer), also in vivo which consists of specific activity of catalase (Maté), and histopathology examination. This study used 32 Sprague Dawley rats which were divided into two groups, the test group (given cranberry fruit extract) and control group. Each group is further divided into 4 subgroups (normoxia, 1, 7, and 14 days hypoxia). Test result showed cranberry fruit extract contain alkaloids (66.118 µg/mL), phenols (351.64 µg/mL), anthocyanins, betacyanin, cardio glycosides, coumarins, flavonoids, glycosides, quinones, steroids, terpenoids, and tannins, total antioxidant capacity IC_{50} 49.760 µg/mL, and the toxicity value LC_{50} 153.081 µg/mL. There was a decrease in catalase specific activity with increasing duration of hypoxia treatment, catalase specific activity of the test group was higher than the control group, and there was a very strong correlation between catalase specific activity in the heart and blood. The rat's heart histopathology image of the test group showed less damage than the control group.*

*Keywords: oxidative stress, *Vaccinium macrocarpon* Aiton, catalase, heart, blood*

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
PERNYATAAN ORISINALITAS KARYA ILMIAH	ii
PENGESAHAN SKRIPSI	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	v
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR SINGKATAN.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.2.1 Pernyataan Masalah	2
1.2.2 Pertanyaan Masalah	3
1.3 Hipotesis Penelitian.....	3
1.4 Tujuan Penelitian	4
1.4.1 Tujuan Umum.....	4
1.4.2 Tujuan Khusus	4
1.5 Manfaat Penelitian	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Penelusuran Literatur	5
2.1.1 Stres Oksidatif.....	5
2.1.2 <i>Reactive Oxygen Species (ROS)</i>	6
2.1.3 Oksigen	8
2.1.4 Hipoksia	9
2.1.5 Jantung	11
2.1.6 Antioksidan.....	12
2.1.7 Katalase.....	13
2.1.8 Kranberi (<i>Vaccinium macrocarpon Aiton</i>)	15
2.1.9 Metode Ekstraksi	17

2.1.10 Pelarut Ekstraksi	19
2.1.11 Studi <i>in Vivo</i> pada Hewan Coba	20
2.2 Kerangka Teori.....	22
2.3 Kerangka Konsep.....	23
BAB 3 METODE PENELITIAN.....	24
3.1 Desain Penelitian.....	24
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	24
3.3 Sampel Penelitian.....	24
3.3.1 Sampel Penelitian	24
3.3.2 Hewan Percobaan	25
3.4 Perkiraan Besar Sampel	25
3.5 Cara Kerja / Prosedur Kerja Penelitian	26
3.5.1 Pengambilan Sampel.....	26
3.5.2 Identifikasi Tanaman	26
3.5.3 Pembuatan Ekstrak	26
3.5.4 Uji Fitokimia.....	27
3.5.5 Pengukuran Kapasitas Total Antioksidan dengan Larutan DPPH (Blois) ..	29
3.5.6 Pengukuran Kadar Fenolik Total (Singleton & Rossi).....	31
3.5.7 Pengukuran Kadar Alkaloid total (Trivedi, dkk.).....	32
3.5.8 Pengukuran Toksisitas dengan Metode BSLT (Meyer)	33
3.5.9 Perlakuan pada Hewan Coba	34
3.5.10 Pengambilan Organ Jantung dan Darah Tikus	35
3.5.11 Pembuatan Homogenat Organ Jantung Tikus	36
3.5.12 Pembuatan Lisat 50%	37
3.5.13 Pengukuran Aktivitas Spesifik Enzim Katalase (Maté)	37
3.5.14 Pemeriksaan Patologi Anatomi Jantung	39
3.6 Variabel Penelitian.....	40
3.6.1 Variabel Bebas.....	40
3.6.2 Variabel Terikat	40
3.6.3 Variabel Antara.....	40
3.7 Definisi Operasional.....	41
3.7.1 Hipoksia.....	41
3.7.2 Katalase.....	41

3.8 Instrumen Penelitian.....	41
3.8.1 Alat Penelitian.....	41
3.8.2 Bahan Penelitian	42
3.9 Pengumpulan Data	42
3.10 Analisis Data	42
3.11 Keterangan Lolos Kaji Etik.....	43
3.12 Alur Penelitian	44
BAB 4 HASIL PENELITIAN	45
4.1 Uji Fitokimia	45
4.2 Kapasitas Total Antioksidan buah kranberi dengan Larutan DPPH (Blois).....	45
4.2.1 Panjang Gelombang Serapan Maksimum DPPH.....	45
4.2.2 Uji Ekstrak Buah Kranberi	46
4.2.3 Larutan Pembanding : Asam Askorbat.....	47
4.3 Pengukuran Kadar Fenolik Total (Singleton & Rossi)	48
4.4 Pengukuran Kadar Alkaloid Total	49
4.5 Uji Toksisitas dengan Metode BSLT (Meyer).....	50
4.6 Pengukuran Aktivitas Spesifik Enzim Katalase (Maté).....	51
4.6.1 Perhitungan Konsentrasi Hidrogen Peroksida (H ₂ O ₂)	51
4.6.2 Penentuan Waktu dan Pengenceran Optimum.....	52
4.6.3 Pembuatan Kurva Standar Protein dengan Metode Warburg – Christian ..	56
4.6.4 Pengukuran Kadar Protein Sampel.....	57
4.6.5 Aktivitas Spesifik Enzim Katalase	58
4.6.6 Hubungan Aktivitas Spesifik Enzim Katalase pada Jantung dan Darah	65
4.7 Pemeriksaan Patologi Anatomi Jantung.....	67
BAB 5 PEMBAHASAN	69
5.1 Uji Fitokimia	69
5.2 Uji Kapasitas Total Antioksidan buah kranberi dengan Larutan DPPH (Blois) 69	
5.3 Kadar Fenolik Total (Singleton & Rossi)	70
5.4 Kadar Alkaloid Total (Trivedi, dkk.)	70
5.5 Uji Toksisitas dengan Metode BSLT (Meyer).....	70
5.6 Aktivitas Spesifik Enzim Katalase (Maté).....	71
5.7 Pemeriksaan Patologi Anatomi	73
5.8 Keterbatasan Penelitian.....	73

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN.....	74
6.1 Kesimpulan	74
6.2 Saran.....	75
DAFTAR PUSTAKA	76
LAMPIRAN.....	82

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Contoh-contoh pelarut ekstraksi	19
Tabel 4.1 Hasil uji fitokimia	45
Tabel 4.2 Persen inhibisi berdasarkan konsentrasi dan IC ₅₀ ekstrak buah kranberi ...	46
Tabel 4.3 Persen inhibisi berdasarkan konsentrasi dan IC ₅₀ asam askorbat	47
Tabel 4.4 Absorbansi larutan standar <i>tannin</i> berdasarkan konsentrasi	48
Tabel 4.5 Kadar fenolik total ekstrak buah kranberi.....	49
Tabel 4.6 Absorbansi larutan <i>berberine chloride</i> berdasarkan konsentrasi	49
Tabel 4.7 Kadar alkaloid total ekstrak buah kranberi	50
Tabel 4.8 Angka mortalitas berdasarkan konsentrasi ekstrak buah kranberi.....	51
Tabel 4.9 Optimasi waktu dan pengenceran homogenat organ jantung uji	53
Tabel 4.10 Optimasi waktu dan pengenceran homogenat organ jantung kontrol.....	54
Tabel 4.11 Optimasi waktu dan pengenceran lisat darah 50% uji	55
Tabel 4.12 Optimasi waktu dan pengenceran lisat darah 50% kontrol.....	55
Tabel 4.13 Absorbansi standar <i>bovine serum albumin</i> (BSA).....	56
Tabel 4.14 Kadar protein homogenat jantung kelompok uji.....	57
Tabel 4.15 Kadar protein homogenat jantung kelompok kontrol	57
Tabel 4.16 Kadar protein lisat darah 50% kelompok uji	58
Tabel 4.17 Kadar protein lisat darah 50% kelompok kontrol	58
Tabel 4.18 Rata-rata aktivitas spesifik enzim katalase jantung kelompok uji	59
Tabel 4.19 Rata-rata aktivitas spesifik enzim katalase jantung kelompok kontrol.....	60
Tabel 4.20 Rata-rata aktivitas spesifik enzim katalase darah kelompok uji	62
Tabel 4.21 Rata-rata Aktivitas spesifik enzim katalase darah kelompok kontrol.....	63

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Mekanisme kerja gen HIF-1	11
Gambar 2.2 Tanaman <i>Vaccinium macrocarpon Aiton</i>	17
Gambar 2.3 Buah <i>Vaccinium macrocarpon Aiton</i>	17
Gambar 2.4 Kerangka teori	22
Gambar 2.5 Kerangka konsep	23
Gambar 3.1 Alur Penelitian.....	44
Gambar 4.1 Kurva persen inhibisi ekstrak buah kranberi.....	46
Gambar 4.2 Kurva persen inhibisi asam askorbat.....	47
Gambar 4.3 Kurva standar <i>tannin</i>	48
Gambar 4.4 Kurva standar <i>berberine chloride</i>	50
Gambar 4.5 Kurva uji toksisitas ekstrak buah kranberi	51
Gambar 4.6 Kurva standar BSA.....	56
Gambar 4.7 Aktivitas spesifik katalase jantung kelompok uji.....	59
Gambar 4.8 Aktivitas spesifik katalase jantung kelompok kontrol	60
Gambar 4.9 Aktivitas spesifik katalase jantung kelompok kontrol dan uji	61
Gambar 4.10 Aktivitas spesifik katalase darah kelompok uji.....	62
Gambar 4.11 Aktivitas spesifik katalase darah kelompok kontrol	64
Gambar 4.12 Aktivitas spesifik katalase darah kelompok kontrol dan uji	65
Gambar 4.13 Grafik hubungan aktivitas spesifik enzim katalase pada darah dengan jantung tikus kelompok uji.....	66
Gambar 4.14 Grafik hubungan aktivitas spesifik enzim katalase pada darah dengan jantung tikus kelompok kontrol	67
Gambar 4.15 Gambaran histopatologi jantung kelompok kontrol dengan perlakuan hipoksia 14 hari	68
Gambar 4.16 Gambaran histopatologi jantung kelompok uji dengan perlakuan hipoksia 14 hari	68

DAFTAR SINGKATAN

ATP	Adenosin Trifosfat
BHT	<i>Butylated Hydroxytoulene</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
BSLT	<i>Brine Shrimp Lethality Test</i>
CAT	<i>Catalase (Katalase)</i>
CH ₃ COCH ₃	Aseton
CO ₂	Karbondioksida
Cu	Cuprum (Tembaga)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DPPH	<i>2,2-difenil-1-pikrilhidrazil</i>
EDTA	<i>Etilenadiaminatetraasetat</i>
eNOS	<i>Endothelial nitric oxide synthase</i>
Fe	<i>Ferrum (Besi)</i>
FeCl ₃	<i>Ferric Chloride (besi(iii) klorida)</i>
g	Gram
GPx	<i>Glutathione Peroxidase</i>
GRx	<i>Glutathione Reductase</i>
H ₂ O	Air
H ₂ O ₂	Hidrogen peroksida
H ₂ SO ₄	Asam sulfat
Hb	Hemoglobin
HCl	Asam hidroklorida
HE	<i>Hematoxylin-Eosin</i>
HIF-1	<i>Hypoxia inducible factor-1</i>
Hz	<i>Hertz</i>
kg	Kilogram
LDL	<i>Low Density Liporotein</i>

MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
mg	Miligram
mL	Mililiter
Mn	Mangan
ms	<i>Milisecond</i>
mtDNA	<i>Mitochondrial DNA</i>
Na ₂ CO ₃	Natrium Karbonat
Na ₂ HPO ₄	<i>Disodium Hydrogen Phosphate, Anhydrate</i>
NAD ⁺	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	<i>Sodium Dihydrogen Phosphate, Monohydrate</i>
NaOH	Natrium hidroksida
nm	Nanometer
NO	<i>Nitric oxide</i>
O ₂	Oksigen
O ₂ ^{•-}	Anion Superoksida
OH [•]	Hidroksil
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PHD2	<i>Prolyl Hydroxylase Domain-Containing Protein 2</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
Ppm	<i>Part per million</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
Rpm	<i>Revolutions per minute</i>
s	<i>Second</i>
SOD	Superoksida Dismutase
U	Unit
UAE	<i>Ultrasound-assisted Extraction</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
μL	Mikroliter

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Persetujuan etik.....	82
Lampiran 2 Hasil identifikasi tumbuhan.....	83
Lampiran 3 Hasil pengujian.....	84
Lampiran 4 Dokumentasi selama penelitian.....	111
Lampiran 5 Daftar riwayat hidup.....	115

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Menurut data dari WHO, hampir 70% kematian di dunia disebabkan oleh penyakit tidak menular, termasuk di dalamnya penyakit kardiovaskuler, kanker, diabetes, dan penyakit pernafasan kronis.¹ Dasar patofisiologi dari sebagian besar penyakit tersebut dikaitkan dengan stres oksidatif, yaitu suatu kondisi dimana terjadi ketidakseimbangan pembentukan dan penghancuran *Reactive Oxygen Species* (ROS).²

Reactive Oxygen Species merupakan suatu spesies kimia yang mengandung paling sedikit satu atom oksigen pada setiap molekulnya namun memiliki sifat yang lebih reaktif daripada oksigen.³ Terdapat beberapa sumber ROS baik yang non enzimatis (sinar X, sinar UV, ion logam transisi) maupun enzimatis (rantai pernafasan).⁴ Selain itu, produksi ROS juga dapat meningkat dalam kondisi hipoksia, yaitu keadaan dimana kadar oksigen tidak berada dalam level yang fisiologis.⁵

Secara fisiologis, ROS memiliki fungsi untuk pertumbuhan sel, pembaharuan sel, kematian sel, migrasi sel, angiogenesis, irama sirkadian, diferensiasi miofibroblas, dan respon imun.⁶ Normalnya, pembentukan dan penghancuran ROS terjadi dalam keadaan yang seimbang.⁷ Namun, kondisi stres oksidatif mengakibatkan ROS yang sebelumnya memiliki manfaat bagi tubuh menjadi merugikan dan menyebabkan kerusakan sel, kematian sel yang tidak diinginkan, bahkan sampai kegagalan organ.⁵ Salah satu organ yang dapat rusak akibat dari stres oksidatif adalah jantung.⁸

Jantung adalah organ yang berperan untuk memompa darah ke seluruh tubuh. Rasio penghantaran oksigen berbanding dengan konsumsi oksigen pada jantung 1,6 – 1,8 kali lebih tinggi dibanding jaringan lain. Hal tersebut menunjukkan bahwa terjadi penggunaan oksigen yang berlebih pada miokardium. Penggunaan oksigen yang berlebih dan keadaan ketika jantung mengalami hipoksia akan menghasilkan lebih banyak ROS yang dapat mengakibatkan kerusakan

jantung, *remodelling*, dan pada akhirnya jantung akan mengalami kegagalan.⁹ Untuk mengatasi kejadian tersebut, terdapat suatu sistem dalam tubuh manusia yang digunakan untuk melawan produksi berlebihan dari ROS yaitu antioksidan.¹⁰

Antioksidan berperan dalam mencegah dan memperbaiki kerusakan yang disebabkan oleh ROS. Antioksidan bisa didapatkan dari luar tubuh (eksogen) melalui makanan dan suplementasi seperti vitamin E, vitamin C, *karotenoids*, *flavonoids*, asam lemak omega-3, omega-6, dan lain-lain. Antioksidan juga dapat dihasilkan dari dalam tubuh (endogen). Salah satu antioksidan dari dalam tubuh manusia yaitu *Super Oxide Dismutase* (SOD) yang berperan mereduksi anion radikal superoxide ($O_2^{\bullet-}$) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2). Selanjutnya H_2O_2 akan diproses lebih lanjut oleh enzim glutathion peroksidase dan katalase.^{10,11}

Katalase merupakan enzim yang diekspresikan di peroksisom dari hampir semua tipe sel mamalia kecuali eritrosit dan sel vaskuler manusia. Kadar katalase akan meningkat ketika H_2O_2 intrasel meningkat.¹² Katalase secara efisien mengubah H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 tanpa mengonsumsi substrat donor elektron tambahan.¹³

Salah satu sumber dari antioksidan eksogen adalah buah kranberi. Buah yang berasal dari Amerika Utara ini merupakan salah satu buah yang memiliki efek antioksidan terbaik dibandingkan buah lainnya. Kandungan antioksidan dalam buah ini antara lain *flavonols*, *anthocyanins*, dan asam fenolik. Kranberi diketahui memiliki manfaat untuk mencegah infeksi traktus urinarius, mengobati ulkus peptikum, dan memiliki efek potensial untuk mencegah dan mengurangi resiko penyakit kardiovaskuler.¹⁴ Oleh karena itu, peneliti ingin mengetahui efek kranberi terhadap ROS berlebihan yang dihasilkan dalam kondisi hipoksia pada organ jantung.

1.2 Rumusan Masalah

1.2.1 Pernyataan Masalah

Belum diketahuinya efek pemberian ekstrak buah kranberi (*Vaccinium macrocarpon Aiton*) terhadap aktivitas spesifik enzim katalase tikus *Sprague Dawley* yang telah diinduksi hipoksia sistemik kronik.

1.2.2 Pertanyaan Masalah

1. Bagaimanakah hasil uji fitokimia dari ekstrak buah kranberi?
2. Berapakah kapasitas total antioksidan ekstrak buah kranberi?
3. Berapakah kadar fenolik total ekstrak buah kranberi?
4. Berapakah kadar alkaloid total ekstrak buah kranberi?
5. Bagaimanakah hasil uji toksisitas pada ekstrak buah kranberi?
6. Bagaimanakah pengaruh perlakuan hipoksia sistemik kronik terhadap aktivitas spesifik enzim katalase pada jantung dan darah tikus *Sprague Dawley* kelompok uji dan kelompok kontrol?
7. Bagaimanakah pengaruh pemberian ekstrak buah kranberi terhadap aktivitas spesifik enzim katalase pada jantung dan darah tikus *Sprague Dawley* yang diinduksi hipoksia sistemik kronik?
8. Bagaimanakah hubungan antara aktivitas spesifik enzim katalase pada jantung dan darah tikus *Sprague Dawley* kelompok uji dan kelompok kontrol?
9. Bagaimanakah gambaran patologi anatomi organ jantung tikus *Sprague Dawley* yang diberi ekstrak buah kranberi setelah diinduksi hipoksia sistemik kronik?

1.3 Hipotesis Penelitian

1. Terjadi penurunan aktivitas spesifik enzim katalase pada jantung dan darah tikus *Sprague Dawley* kelompok uji dan kontrol seiring bertambah lamanya perlakuan hipoksia sistemik kronik
2. Terjadi peningkatan aktivitas spesifik enzim katalase pada jantung dan darah tikus *Sprague Dawley* yang diinduksi hipoksia sistemik kronik setelah diberi ekstrak buah kranberi
3. Terdapat hubungan yang sangat kuat antara aktivitas spesifik enzim katalase pada jantung dan darah tikus *Sprague Dawley* baik kelompok uji yang diberi ekstrak buah kranberi maupun kelompok kontrol

1.4 Tujuan Penelitian

1.4.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui efek pemberian ekstrak buah kranberi (*Vaccinium macrocarpon Aiton*) terhadap aktivitas spesifik enzim katalase tikus *Sprague Dawley* yang telah diinduksi hipoksia sistemik kronik.

1.4.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui hasil uji fitokimia dari ekstrak buah kranberi.
2. Mengetahui kapasitas total antioksidan ekstrak buah kranberi.
3. Mengetahui kadar fenolik total ekstrak buah kranberi.
4. Mengetahui kadar alkaloid total ekstrak buah kranberi.
5. Mengetahui hasil uji toksisitas pada ekstrak buah kranberi.
6. Mengetahui pengaruh perlakuan hipoksia sistemik kronik terhadap aktivitas spesifik enzim katalase pada jantung dan darah tikus *Sprague Dawley* kelompok uji dan kelompok kontrol.
7. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak buah kranberi terhadap aktivitas spesifik enzim katalase pada jantung dan darah tikus *Sprague Dawley* yang diinduksi hipoksia sistemik kronik.
8. Mengetahui hubungan antara aktivitas spesifik enzim katalase pada jantung dan darah tikus *Sprague Dawley* kelompok uji dan kelompok kontrol.
9. Mengetahui gambaran patologi anatomi organ jantung tikus *Sprague Dawley* yang diberi ekstrak buah kranberi setelah diinduksi hipoksia sistemik kronik.

1.5 Manfaat Penelitian

- Menjembatani kesenjangan antara penelitian ilmu dasar kedokteran dengan aplikasinya secara klinis.
- Sebagai sumber referensi untuk penelitian selanjutnya.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Penelusuran Literatur

2.1.1 Stres Oksidatif

Stres oksidatif didefinisikan sebagai ketidakseimbangan antara prooksidan dan antioksidan. Prooksidan merupakan suatu substansi yang mampu membentuk *reactive species* atau mampu menginduksi stres oksidatif, sedangkan antioksidan merupakan substansi yang mampu menghambat atau mencegah substrat prooksidan untuk mengalami oksidasi. Stres oksidatif dikaitkan dengan banyak penyakit kronis seperti diabetes, hipertensi, penyakit kardiovaskuler, penyakit neurodegeneratif, penyakit hati alkoholik, penyakit ginjal kronis, kanker, dan penuaan.²

Efek stres oksidatif pada DNA terjadi melalui berbagai reaksi biokimia yang menghasilkan *reactive toxic intermediates*. Reaksi ini menimbulkan kerusakan DNA, kerusakan DNA dapat memicu terjadinya mutasi DNA, dan mutasi DNA akan menyebabkan kanker. Efek stres oksidatif terhadap protein dapat irreversibel ataupun reversibel. Modifikasi irreversibel yang utama adalah *protein carbonylation* dan *tyrosine nitration* yang menimbulkan efek merugikan bagi protein. Modifikasi reversibel berupa modifikasi *protein cysteine*. Modifikasi ini memiliki efek protektif terhadap protein target dari kerusakan lebih lanjut. Sebagai tambahan, oksidasi *cysteine* yang reversibel juga terlibat dalam kaskade pensinyalan redoks untuk mencegah kejadian membahayakan yang tidak terduga seperti stroke dan serangan jantung. Pengaruh stres oksidatif terhadap jalur pensinyalan dapat terjadi melalui beberapa mekanisme di antaranya melalui jalur *mitogen activated protein kinase* (MAPK) yang berperan dalam apoptosis sel serta *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K) yang berperan dalam proliferasi dan respon *survival* sel.¹⁰

2.1.2 Reactive Oxygen Species (ROS)

Dalam kondisi fisiologis, transpor elektron ke O₂ terjadi berulang kali secara ketat melalui reaksi fosforilasi oksidatif untuk sintesis ATP. Namun, fosforilasi oksidatif merupakan sumber ROS endogen yang mayor seperti O₂•⁻ (*superoxide anion radical*), H₂O₂, dan •OH (*hydroxyl radical*) yang merupakan produk racun dari pernafasan.¹⁵

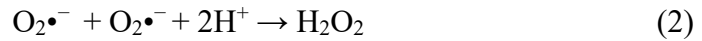
Oksigen di rantai pernafasan mitokondria dapat dilepaskan dan diubah ke dalam bentuk anion radikal *superoxide* (O₂•⁻) dengan mengonsumsi 1 elektron dari rantai pernafasan tersebut. *Superoxide* dihasilkan dari oksidasi tidak sempurna oksigen menjadi air. ROS banyak dihasilkan di kompleks I dan III mitokondria. Selain itu, ROS juga dihasilkan dalam jumlah kecil oleh *glycerolphosphate dehydrogenase*, sebuah protein yang dapat mentransfer elektron ke *coenzyme Q pool*, *electron transfer flavoprotein* (ETF) yang menerima elektron dari proses oksidasi asam lemak, dan *multisubunit pyruvate dehydrogenase complex* yang diduga sebagai sumber *superoxide* dan hidrogen peroksida pada kondisi bioavailabilitas NAD⁺ rendah.¹⁶

Rantai transpor elektron mitokondria kaya akan kofaktor logam seperti heme (kompleks II, III, dan IV) dan kluster besi-sulfur (kompleks I, II, III). Dalam kondisi patologis, penurunan atau kelainan dari rantai transpor elektron meningkatkan produksi ROS. Paparan akut ROS dapat menginaktifkan inti besi-sulfur dari kompleks I, II, III, *aconitase* siklus Krebs, menyebabkan matinya produksi energi oleh mitokondria. Paparan ROS kronik menyebabkan kerusakan oksidatif terhadap mitokondria, protein seluler, lipid, dan asam amino. Maka dari itu, stres oksidatif yang diinduksi oleh produksi berlebihan ROS diasosiasikan dengan patogenesis dari berbagai penyakit.¹⁵

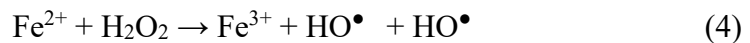
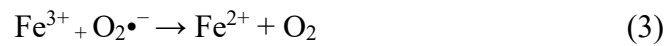
Secara kimiawi, terdapat tiga tipe reaksi yang dapat membentuk ROS. Pertama, dengan mereduksi satu elektron dari O₂ menjadi anion *superoxide* (O₂•⁻) yang dikatalase oleh logam transisi termasuk besi (Fe) dan tembaga (Cu)



Kedua, oksidasi dan reduksi $O_2^{\bullet-}$ secara bersamaan menjadi hidrogen peroksida H_2O_2 dan tambahan satu elektron pada $O_2^{\bullet-}$ untuk menghasilkan *hydroxyl* radikal (HO^{\bullet}). Dalam membran biologis, $O_2^{\bullet-}$ dapat berperan dalam 4 mode berbeda: sebagai elektron transfer, substitusi *nucleophilic*, deprotonisasi, dan abstraksi atom hidrogen seperti



Ketiga, anion *superoxide* yang diinisiasi melalui *Fenton-type reaction* dan penguraian dari H_2O_2 membutuhkan $O_2^{\bullet-}$ dan H_2O_2 sebagai prekursor dari Fe dan Cu sebagai pelengkap. HO^{\bullet} adalah molekul yang paling menghasilkan kerusakan dalam sistem biologi. Reaksi ini disebut sebagai *Fenton-like reaction* membentuk O_2 dan HO^{\bullet} ketika Fe^{2+} dan Cu bereaksi dengan H_2O_2



Gabungan dari reaksi (3) dan (4), atau reaksi Haber-Weiss yang terdapat pada reaksi (5) di atas mendemonstrasikan pembentukan HO^{\bullet} oleh penguraian H_2O_2 yang dikatalisis logam. Interaksi antara $O_2^{\bullet-}$ dan H_2O_2 adalah sumber utama kerusakan sistem biologis terkait dengan produksi HO^{\bullet} yang sangat beracun. Pembentukan ROS juga terjadi secara endogen melibatkan enzim, neutrofil, dan organel seperti mitokondria dan secara eksogen yang diinduksi oleh radiasi, polutan, *xenobiotics* dan racun.¹⁷

Di samping efek merugikannya, ROS memiliki berbagai kegunaan terutama sebagai molekul pensinyalan. ROS memiliki peran krusial dalam aktivasi gen, pertumbuhan sel, modulasi reaksi kimiawi dalam sel. ROS juga berperan dalam mengendalikan tekanan darah, fungsi kognitif, jalur pensinyalan respon imun, mediator biosintesis dari prostaglandin, perkembangan embrio, dan sebagai molekul pensinyalan bagi sel dan antar sel selama masa hidupnya.¹⁸

2.1.3 Oksigen

Oksigen berada di sekitar kita dalam bentuk molekul diatomik. Sekitar 99% O₂ di atmosfer (sekitar $3,7 \times 10^9$ molekul) merupakan isotop oksigen-16, namun juga terdapat oksigen-17 dan oksigen-18. Oksigen merupakan elemen paling umum yang ada di kerak bumi (sekitar 53,8%) dan 21% dari atmosfer.¹⁹

Oksigen memiliki dua elektron yang tidak berpasangan pada cincin terluarnya dan tersusun dalam konfigurasi kuantum *spin paralel*. Konfigurasi ini merupakan kondisi stabil dari oksigen dan disebut sebagai *ground-state*. Dua elektron yang tidak berpasangan di cincin terluar oksigen menyebabkan oksigen cenderung bersifat oksidator atau akseptor elektron. Namun, dengan konfigurasi kuantum *spin paralel*, menyebabkan oksigen cenderung mengambil dua elektron sekaligus dengan bilangan *spin* berlawanan. Karena kebanyakan molekul non-radikal sudah memiliki elektron yang berpasangan dengan bilangan *spin* berlawanan, hal ini menyebabkan molekul-molekul tersebut tidak dapat menjadi donor elektron bagi oksigen dan oksigen menjadi tidak terlalu reaktif terhadap molekul non-radikal. Hukum termodinamika dasar menyatakan bahwa kompleks senyawa organik dalam tubuh manusia dengan cepat akan teroksidasi oleh oksigen di udara, tetapi dengan adanya faktor bilangan *spin* dan kebanyakan molekul dalam tubuh manusia bersifat non-radikal, hal ini menyebabkan kecepatan oksidasi menjadi lebih lambat. Oksigen mampu bereaksi secara cepat dengan molekul radikal, namun tranfer elektronnya harus berjalan satu per satu.¹⁹

Oksigen terkadang disebut sebagai gas Janus karena memiliki manfaat dan efek samping yang merusak secara bersamaan. Oksigen terlibat dalam transfer elektron berenergi tinggi dan membantu pembentukan ATP dalam jumlah besar melalui fosforilasi oksidatif. Namun, hasil dari reaksi ini menyebabkan oksigen memiliki potensi untuk merusak molekul seperti protein, lipid, ataupun DNA.²⁰

Manusia hidup bergantung dengan O₂ untuk respirasi.^{4,21,22} Terdapat dua proses respirasi, pertama yaitu respirasi eksternal dimana oksigen masuk melalui hidung sampai ke paru-paru, selanjutnya dari alveolus akan dibawa oleh darah (baik larut secara fisik dan sebagian besar terikat dengan hemoglobin), kemudian sampai di kapiler akan berdifusi ke jaringan. Selanjutnya, respirasi selular yaitu proses metabolik intrasel yang dilaksanakan dalam mitokondria.²¹ Peran utama oksigen

adalah dengan membantu pembentukan ATP melalui reaksi terkontrol antara hidrogen dengan oksigen untuk membentuk air.⁴ Fungsi O₂ sebagai akseptor elektron terakhir pada rantai pernafasan di dalam mitokondria. Jika terdapat O₂, akan terjadi metabolisme secara aerob dengan hasil total 38 ATP dari setiap pemecahan 1 molekul glukosa. Hal ini jauh berbeda jika tubuh berada dalam keadaan hipoksia yang hanya akan menghasilkan total 2 ATP dalam metabolisme secara anaerob.^{4,22}

2.1.4 Hipoksia

Hipoksia adalah keadaan dimana rendahnya kadar oksigen dan tekanan parsialnya dalam sel. Respon terhadap kondisi hipoksia bergantung dari jenis sel itu sendiri, respon tersebut juga dapat bervariasi mulai dari adaptasi substansial sampai kematian sel. Secara umum, hipoksia dapat disebabkan oleh 3 abnormalitas yaitu hipoksemia, gangguan penghantaran oksigen ke jaringan, dan gangguan ekstraksi / penggunaan oksigen.²³

Hipoksemia berarti sedikitnya kandungan oksigen dalam aliran darah arteri. Hipoksemia terjadi karena beberapa faktor. Faktor pertama yaitu kandungan oksigen yang dihirup. Tekanan oksigen yang dihirup saat berada di ketinggian air laut adalah 150 mmHg, tekanan ini akan turun secara progresif seiring dengan kenaikan ketinggian. Faktor berikutnya yang berperan adalah ventilasi alveolar. Ventilasi alveolar yang baik akan membuat oksigen dapat tersaturasi secara penuh dengan hemoglobin, hal ini penting karena oksigen tidak dapat larut dalam darah. Ventilasi alveolar dapat turun karena peningkatan CO₂. Faktor lain yang berpengaruh adalah waktu difusi dan pengikatan Hb oleh O₂. Normalnya, proses ini berlangsung selama 250 ms, dapat terpenuhi dengan baik karena waktu transit sel darah merah di kapiler alveolus adalah 500 – 750 ms. Namun, waktu transit ini dapat lebih pendek dari 250 ms dalam keadaan tertentu seperti olahraga berat. Faktor terakhir yang berperan adalah jumlah Hb dan kemampuannya untuk berikatan dengan oksigen itu sendiri. Semakin kuat O₂ berikatan dengan Hb (*shift to the left* dalam kurva disosiasi oksigen), semakin sulit pula pelepasannya ke jaringan. *Shift to the left* yang parah dan gangguan fungsi Hb dapat terjadi ketika *oxygen-binding sites* terganggu ataupun terhalang (contohnya methemoglobin,

sulfhemoglobin, karboksihemoglobin). Di lain sisi, *shift to the right* kurva berarti lebih sedikit O₂ yang berikatan dengan Hb dan hal ini memfasilitasi penghantaran oksigen ke jaringan.²³

Penghantaran oksigen ke jaringan adalah proses membawa oksigen dari kapiler alveolar ke jaringan. Penghantaran oksigen bergantung pada 2 faktor yaitu kandungan oksigen dan curah jantung. Curah jantung dapat meningkat dalam kondisi olahraga ataupun penyakit (misalnya sepsis), dapat juga turun pada penyakit lainnya. Selain itu penghantaran oksigen ke jaringan juga dipengaruhi secara regional, misalnya dalam keadaan olahraga, aliran darah ke otot skeletal akan meningkat signifikan dan ke kulit ataupun usus akan menurun.²³

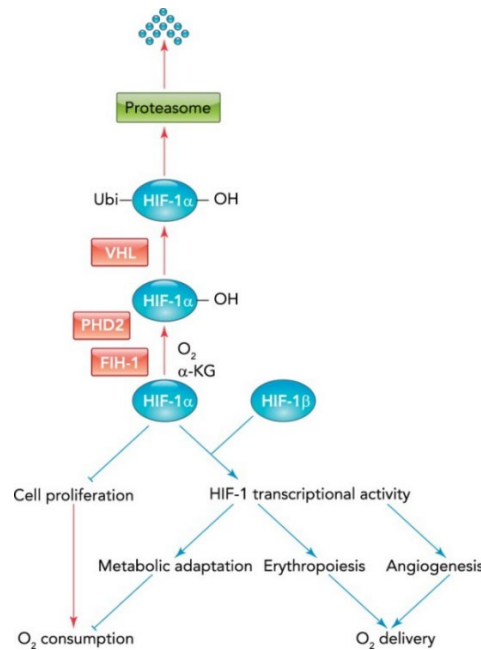
Ekstraksi / penggunaan oksigen adalah proses memindahkan oksigen dari molekul Hb ke sitoplasma sel sampai mitokondria. Hal ini dipengaruhi oleh kurva disosiasi oksigen. Dalam kondisi istirahat, hanya 25% oksigen yang meninggalkan darah dan masuk ke jaringan, sedangkan dalam kondisi olahraga, ekstraksi oksigen dapat mencapai 50 – 75%. Ekstraksi oksigen pada setiap jaringan juga berbeda-beda sesuai kebutuhan masing-masing seperti pada jantung sebesar 11% sedangkan pada otot skeletal sebesar 30%.²³

Terdapat mekanisme dalam tubuh manusia untuk merespon keadaan hipoksia. Sensor untuk mendeteksi hipoksia dalam tubuh manusia disebut badan karotis yang terletak di *bifurcatio* arteri karotis interna dan eksterna. Respon yang ditimbulkan dari sensor ini sangat cepat (0,2 – 0,4 s setelah stimulus). Dari stimulus pada badan karotis, akan memicu serangkaian reaksi yang dikendalikan oleh faktor transkripsi HIF. HIF memiliki fungsi sebagai *master regulators of oxygen homeostasis* dengan mengatur *supply* dan *demand* dari oksigen.²⁴

Dalam keadaan normal, dioksigenisasi PHD2 dan FIH-1 membutuhkan O₂ dan α -ketoglutarate sebagai substrat untuk hidroksilasi *proline* dan *asparagine* yang merupakan residu dari HIF-1 α , reaksi ini mengakibatkan dihambatnya stabilitas protein dan aktivitas transkripsi HIF-1 α . Hidroksilasi *prolyl* oleh PHD2 menyebabkan terikatnya protein VHL yang merekrut *ubiquitin* sehingga terjadi degradasi proteasomal HIF-1 α .²⁴

Dalam keadaan hipoksia, HIF-1 α akan meregulasi sekitar 1500 gen yang akan membuat tubuh beradaptasi terhadap kondisi hipoksia tersebut, di antaranya

melalui mekanisme eritropoiesis, angiogenesis, adaptasi metabolik, dan penghentian proliferasi sel.²⁴



Gambar 2.1 Mekanisme kerja gen HIF-1²⁴

2.1.5 Jantung

Jantung merupakan organ yang berperan untuk menyediakan darah melalui pembuluh darah untuk dialirkan ke jaringan dalam jumlah yang mencukupi, baik tubuh dalam keadaan istirahat maupun dalam keadaan latihan berat. Jantung merupakan bagian dari sistem sirkulasi tubuh. Jantung berkontraksi sekitar 3 miliar kali pada manusia mulai dari beberapa hari setelah pembuahan hingga meninggal, hanya berhenti sepersekian detik untuk mengisi di antara denyut-denyut.²¹

Jantung membutuhkan *supply* energi secara konstan untuk mendukung aktivitas kontraktilnya. Kebutuhan ini tercukupi melalui sintesis ATP via fosforilasi oksidatif. Dalam keadaan normal, 70% kebutuhan ATP jantung tercukupi melalui katabolisme asam lemak bebas via *β-oxidation*, memberikan jumlah ATP yang lebih besar dari glukosa. Namun, fosforilasi oksidatif merupakan sumber endogen dari ROS. Paparan kronis ROS terhadap miosit dapat mengakibatkan gangguan fungsi eksitasi – kontraksi, menyebabkan aritmia, *cardiac remodelling* dengan menginduksi hipertrofi, apoptosis, nekrosis, dan fibrosis.¹⁵

Infark miokard adalah kematian sel miokard karena iskemi ireversibel yang berlanjut mejadi nekrosis.²⁵ Disfungsi dari mitokondria miosit merupakan konsekuensi dari infark miokard. Gangguan fungsi mitokondria ketika iskemi miokard disebabkan oleh stres oksidatif. Dalam keadaan iskemi miokard, penghantaran oksigen ke miokardium tidak mencukupi kebutuhan untuk fosforilasi oksidatif, meninggalkan rantai transfer elektron dalam keadaan sangat tereduksi, sehingga terjadi banyak kebocoran elektron, dan menyebabkan perubahan residu O_2 menjadi $O_2^{\bullet-}$. Selain itu, akan terjadi juga inaktivasi protein rantai transfer elektron, enzim antioksidan, peroksidasi lipid, dan kerusakan mtDNA.¹⁵

Produksi berlebihan ROS mengakibatkan kerusakan jantung melalui beberapa mekanisme seperti mengaktifkan jalur pensinyalan untuk terjadi hipertrofi sel miosit, memicu kehilangan sel miosit melalui apoptosis, dan mengaktifkan *matrix metalloproteases* yang akan mengubah susunan matriks ekstraseluler. Selanjutnya, jumlah sel miosit akan berkurang, sel miosit yang bertahan akan mengalami elongasi atau hipertrofi untuk mempertahankan curah jantung, ketebalan dinding ventrikel juga akan meningkat. Serupa dengan miosit, sel lain di jaringan jantung seperti fibroblas dan sel endotel akan teraktivasi meningkatkan produksi kolagen dan terjadi fibrosis yang mengakibatkan terjadinya *remodelling* jantung sebagai bentuk kompensasi. Jika kompensasi yang dilakukan oleh jantung tidak berhasil, akhirnya jantung akan mengalami kegagalan.⁹

2.1.6 Antioksidan

Antioksidan secara signifikan dapat menunda atau mencegah oksidasi dari substrat yang mampu mengalami oksidasi ketika konsentrasinya lebih rendah daripada substrat tersebut.²⁶ Antioksidan merupakan salah satu mekanisme tubuh manusia untuk melawan stres oksidatif, baik diproduksi secara natural oleh tubuh (endogen) ataupun suplementasi dari luar tubuh (eksogen). Antioksidan tersebut berperan sebagai *scavenger* radikal bebas.^{10-12,26,27}

Antioksidan endogen dapat diklasifikasikan sebagai antioksidan enzimatik dan non-enzimatik. Antioksidan enzimatik yang utama di antaranya *superoxide dismutase (SOD)*, *catalase (CAT)*, *glutathione peroxidase (GPx)*, dan *glutathione reductase (GRx)*. Antioksidan non-enzimatik juga dibagi menjadi antioksidan

metabolik dan nutrien. Antioksidan metabolik merupakan antioksidan yang dihasilkan dari metabolisme dalam tubuh, contohnya *lipoid acid*, *glutathione*, *L-arginine*, *coenzyme Q10*, *melatonin*, asam urat, bilirubin, *metal-chelating proteins*, *transferrin*, dan lain-lain. Sedangkan antioksidan nutrien merupakan komponen yang tidak dapat diproduksi dari dalam tubuh dan harus didapatkan melalui suplementasi, contohnya vitamin E, vitamin C, karotenoids, *trace metals* (selenium, manganese, zinc), asam lemak omega-3 dan omega-6, beberapa metabolit sekunder tanaman seperti *phenolic*, dan lain-lain.^{10,26}

Metabolit sekunder tanaman merupakan hasil metabolisme tanaman selain gula, asam lemak, asam amino, dan asam nukleat (yang biasa diklasifikasikan sebagai metabolit primer). Metabolit sekunder tanaman memiliki peran untuk pertumbuhan normal, perkembangan, dan pertahanan dari tanaman. Saat ini, ribuan metabolit sekunder tanaman berhasil diidentifikasi. Dalam studi *in vitro* maupun *in vivo*, metabolit sekunder tanaman memiliki aktivitas antioksidan yang sangat baik. Terlebih lagi, diketahui bahwa metabolit sekunder tanaman dapat berinteraksi dengan antioksidan fisiologis dan secara sinergis meningkatkan efek biologisnya.²⁶ Contoh metabolit sekunder tanaman antara lain *alkaloids*, *phenols*, *anthocyanin*, *betacyanin*, *cardio glycosides*, *coumarins*, *flavonoids*, *glycosides*, *quinones*, *saponins*, *steroids*, *terpenoids*, *tannins*, dan lain-lain.²⁸⁻³⁰

Komponen diet yang tidak memiliki kemampuan menetralkan radikal bebas tetapi meningkatkan kemampuan antioksidan endogen dapat diklasifikasikan sebagai antioksidan juga. Antioksidan ideal harus siap menyerap dan mengeleminasi radikal bebas, bekerja dalam domain *aqueous* ataupun membran dan memengaruhi ekspresi gen secara positif. Antioksidan endogen memegang peran penting dalam menjaga fungsi sel tetap optimal, namun dalam kondisi tingginya stres oksidatif, perlu bantuan suplementasi antioksidan dari diet.²⁷

2.1.7 Katalase

Katalase (*hydrogen peroxide oxidoreductase*, EC 1.11.1.6) merupakan suatu enzim antioksidan yang terdistribusi secara luas dan dapat ditemukan pada bakteri, tumbuhan, dan sel binatang.²³ Pada manusia, gen katalase terletak pada lengan pendek kromosom 11 (11p13).²⁴ Gen katalase memiliki sifat sebagai

housekeeping gene karena tidak memiliki TATA *box*, tidak memiliki *initiator element sequence*, dan tinggi akan GC pada promotornya.³¹ Enzim ini merupakan anggota penting dalam pertahanan sel melawan kerusakan oksidatif.^{23, 24}

Terdapat tiga keluarga katalase: *monofunctional catalases*, *bifunctional catalases-peroxidases*, dan *Mn catalases*. *Monofunctional catalases* dan *bifunctional catalases* adalah *heme catalases*, mengandung besi-protoporfirin IX sebagai gugus prostetik pada sisi, aktifnya, sedangkan *Mn catalases* merupakan *nonheme catalases*.²³

Katalase memiliki fungsi dominan dalam disproporsionasi hidrogen peroksida (H₂O₂) menjadi air dan oksigen secara efisien. Sebagai tambahan, katalase juga dapat menguraikan *peroxynitrite*, mengoksidasi *nitric oxide* menjadi *nitric dioxide*, dan memperlihatkan aktivitas sebagai enzim peroksidase yang cukup bermakna serta aktivitas sebagai enzim oksidase yang cukup rendah (seperti pada *O₂-dependent oxidation* dari substrat organik).³¹

Enzim katalase diekspresikan di seluruh organ mayor tubuh. Utamanya, enzim ini terdapat di peroksisom, namun katalase yang fungsional juga ditemukan di sitoplasma, mitokondria, dan membran sitoplasmik.³¹ Ekspresi berlebihan dari enzim katalase telah memperlihatkan efek protektif dari kematian sel yang diinduksi ROS sedangkan insufisiensi dari katalase meningkatkan kematian sel *autophagic*.³² Kaitannya dengan organ jantung, pada keadaan infark miokard, ekspresi berlebihan dari katalase memiliki efek protektif dan membantu proses penyembuhan secara akut maupun kronik.³³

Dalam penelitian yang dilakukan Thangarajan, dkk. didapati bahwa terdapat peningkatan aktivitas spesifik enzim katalase antara hewan coba yang diracuni 3-*nitropropionic acid* (3-NP) tanpa diberi suplementasi *L-Theanine* (komponen mayor asam amino dari teh hijau dan dianggap memiliki efek antioksidan) dengan diberi suplementasi.³⁴ Hal ini juga didukung dengan percobaan oleh Nelson dkk. dimana dilakukan percobaan pada 29 orang relawan berusia 20 – 78 tahun yang diberikan suplementasi Protandim (Lifeline Therapeutics, Inc., Denver, CO, USA) yang mengandung 150 mg *B. monniera* (45% bacosides), 225 mg *S. marianum* (70–80% silymarin), 150 mg bubuk *W. somnifera*, teh hijau, 75 mg 98% *polyphenols* dan 45% (–)-epigallocatechin-3-gallate, dan 75 mg *turmeric* (95% *curcumin*).

Suplementasi Protandim yang dianggap sebagai antioksidan dalam 120 hari meningkatkan $54 \pm 14\%$ aktivitas spesifik katalase eritrosit.³⁵ Hal ini membuktikan bahwa suplementasi antioksidan eksogen dapat meningkatkan aktivitas spesifik enzim katalase.

2.1.8 Kranberi (*Vaccinium macrocarpon* Aiton)

American cranberry atau *Vaccinium macrocarpon* Aiton merupakan tanaman yang pada mulanya hanya terdapat di bagian timur dari Amerika Utara. Tanaman ini kemudian dibudidayakan diseluruh Amerika Utara dan sebagian Eropa, dan saat ini perkebunan terbesarnya terdapat di Wisconsin, Massachusetts, dan New Jersey di Amerika Serikat serta di British Columbia, Kanada.³⁶ Berbagai bagian dari tanaman ini telah digunakan sebagai pewarna, makanan, dan obat-obatan. *Native americans* menggunakan buah kranberi untuk menyembuhkan luka dan keracunan, daunnya untuk gangguan berkemih, diare, dan diabetes, serta infus dari batangnya untuk radang pleura.³⁷

Saat ini, kranberi terbukti dapat mencegah infeksi traktus urinarius karena dapat mencegah *pathogenic P-fimbriated Escherichia coli* melekat pada sel uroepitelial dan menurunkan kemampuan proliferasinya, mencegah ulkus gaster karena dapat mencegah perlekatan *Helicobacter pylori*, dan juga meningkatkan hygiene oral dengan mencegah perlekatan *Streptococcus mutans* pada *hydroxyapatite* gigi. Kranberi juga menunjukkan efek antibakterial, antiviral, antimutagenik, antikarsinogenik, antitumorigenik, antiangiogenik, dan aktivitas antioksidan.³⁸

Akhir-akhir ini, penelitian tentang efek dari kranberi dan komponennya difokuskan untuk pencegahan dan pengobatan penyakit kardiovaskuler. Di antara 20 buah yang paling banyak dikonsumsi di Amerika, kranberi memiliki *total phenol content* yang tertinggi. *Phenol* memiliki banyak efek biologis termasuk kemampuan sebagai antioksidan, modulasi enzim, dan meregulasi ekspresi gen. Eksperimen secara *in vitro* menunjukkan bahwa *phenols* dapat mempengaruhi patogenesis penyakit kardiovaskuler dengan meningkatkan ketahanan dari *low-density lipoproteins* (LDL) terhadap oksidasi, mencegah agregasi platelet dan trombosis, menurunkan tekanan darah, dan menghambat inflamasi.³⁸

Kranberi mengandung *total phenols* sebanyak 507 – 709 mg/100 g, paling tinggi jika dibandingkan dengan buah kebanyakan misalnya *blueberry* (258–531 mg/100 g), apel (185–347 mg/100 g), anggur merah (175–370 mg/100 g), dan *strawberry* (132–368 mg/100 g). Dua kelas utama *phenols* yang terdapat pada kranberi adalah *phenolic acid* (44%) terdiri dari *benzoic acid* (4.7 g/kg berat segar), *hydroxycinnamic acids p-coumaric* (0.25 g/kg), *sinapic* (0.21 g/kg), *caffeic* (0.16 g/kg), *ferulic acids* (0.088 g/kg), dan *flavonoids* (56%) yang terdiri dari *anthocyanins*, *flavonols*, and *flavan-3-ols* (terutama *proanthocyanidins*).³⁸ Kranberi juga terbukti memiliki kemampuan sebagai *free radical scavenger* terbukti dari penelitian yang dilakukan oleh Jiadong Sun, dkk. menggunakan metode DPPH *free radical scavenging* dimana digunakan 100 µL sampel dicampur dengan 100µL 0.20 mM DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) dalam larutan *aqueous methanol 50%* selama 30 menit pada suhu ruang dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm, didapatkan hasil bahwa pada konsentrasi kranberi dari 1250 – 500 µg/mL memiliki kapasitas antioksidan lebih dari 50% (59–84%). Dalam percobaan tersebut, didapatkan IC₅₀ (konsentrasi sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50% radikal bebas) adalah 680 µg/mL, lebih rendah dari kontrol positif *butylated hydroxytoulene* (BHT), sebuah antioksidan komersial dimana didapatkan nilai IC₅₀ sebesar 2200 µg/mL.³⁹ Dari data tersebut, diketahui bahwa buah kranberi memiliki potensi untuk mencegah stres oksidatif yang memicu timbulnya berbagai penyakit kronis jika dikonsumsi.

Hirarki taksonomi *Vaccinium macrocarpon Aiton* adalah sebagai berikut:

Kingdom: Plantae

Subkingdom: Tracheobionta

Super divisi: Spermatophyta

Divisi: Magnoliophyta

Kelas: Magnoliopsida

Sub kelas: Dilleniidae

Ordo: Ericales

Famili: Ericaceae

Genus: *Vaccinium L.*

Spesies: *Vaccinium macrocarpon Aiton*⁴⁰



Gambar 2.2 Tanaman *Vaccinium macrocarpon* Aiton⁴⁰



Gambar 2.3 Buah *Vaccinium macrocarpon* Aiton⁴¹

2.1.9 Metode Ekstraksi

Ekstraksi merupakan langkah krusial pertama untuk menganalisa tanaman obat, karena penting untuk mengekstrak komponen kimiawi yang tepat dari tanaman tersebut untuk langkah selanjutnya. Langkah operasional dasar yang dilakukan termasuk pencucian, pengeringan materi tanaman, *grinding* untuk mendapatkan sampel homogen dan meningkatkan kontak sampel dengan pelarut. Tindakan yang tepat harus diambil untuk menghindari unsur aktif yang ingin diambil tidak hilang, terdistorsi, ataupun rusak.⁴²

Terdapat beberapa prosedur ekstraksi yang bisa digunakan sesuai kebutuhan. Homogenasi jaringan tanaman dalam pelarut merupakan salah satu teknik yang banyak digunakan peneliti. Tanaman segar, basah, atau yang sudah dikeringkan di haluskan dengan blender hingga berwujud partikel halus, kemudian dimasukkan ke dalam pelarut kemudian dikocok 5 – 10 menit atau didiamkan 24

jam, setelah itu hasil ekstraksi disaring. Filtrat (hasil saringan) selanjutnya dikeringkan dan dilarutkan kembali dengan pelarut hingga konsentrasi yang ingin didapatkan. Beberapa peneliti juga melakukan sentrifugasi terhadap filtrat untuk memurnikan ekstrak.⁴³

Maserasi merupakan teknik yang baik digunakan untuk zat bersifat termolabil. Dalam teknik ini, tanaman utuh atau yang sudah dihaluskan menjadi bentuk bubuk dijaga agar tetap berkontak dengan pelarut pada suatu wadah dalam waktu tertentu.⁴³

Metode dekoksi digunakan untuk ekstraksi zat yang tahan panas dan bagian keras dari tanaman (akar, batang). Metode ini dilakukan dengan mendidihkan tanaman yang ingin diekstraksi selama 15 menit, kemudian didinginkan dengan mengalirkan air dingin melalui tanaman tersebut hingga didapatkan volume yang diinginkan.^{43,44}

Perkolasi paling banyak digunakan untuk mengekstraksi bahan aktif dalam bentuk cair. Sebuah perkolator (alat sempit berbentuk seperti *cone* dengan 2 lubang pada ujungnya) biasa digunakan. Bahan padat dibasahkan dengan pelarut secukupnya dan didiamkan selama kurang lebih 4 jam pada wadah tertutup. Setelah itu, dipindahkan ke dalam perkolator dan ditambahkan lagi pelarut di atasnya. Campuran kemudian dibiarkan mengalami maserasi dalam perkolator yang tertutup selama 24 jam. Setelah 24 jam, perkolator dibuka dan cairan di dalamnya dibiarkan menetes perlahan. Pelarut kemudian ditambahkan lagi dan langkah sebelumnya diulang sampai beberapa kali. Cairan yang telah ditampung selanjutnya dimurnikan.⁴³

Microwave assisted extraction (MAE) menggunakan energi *microwave* untuk memfasilitasi pemisahan unsur yang ingin dilarutkan dari sampel ke pelarut. Radiasi *microwave* berinteraksi dengan materi yang dapat terpolarisasi sehingga menyebabkan pemanasan dekat dengan permukaan dari materi tersebut dan panas dipindahkan secara konduksi. Rotasi dipol dari molekul yang diinduksi gelombang elektromagnetik *microwave* mengganggu ikatan hidrogen, meningkatkan migrasi dari ion terlarut dan mempromosikan penetrasi pelarut ke matriks. MAE biasa digunakan untuk molekul bersifat polar dengan konstanta dielektrik tinggi.⁴⁴

Ultrasound-assisted extraction (UAE) atau sonikasi melibatkan *ultrasound* dengan gelombang 20 kHz sampai 2000 kHz. Efek mekanik dari *ultrasound* meningkatkan kontak permukaan antara sampel dengan pelarut dan permeabilitas dinding sel sehingga memfasilitasi pelepasan komponen dan meningkatkan transpor massa dari pelarut ke sel tumbuhan.⁴⁴

2.1.10 Pelarut Ekstraksi

Berdasarkan kelarutan dari komponen bioaktif, terdapat banyak pelarut inorganik, organik, polar, dan, non-polar yang dapat digunakan untuk menghasilkan ekstraksi yang baik. Jika substansi yang ingin diuji bersifat lipofilik, pelarut organik yang dipilih adalah pelarut non-polar, mulai dari yang memiliki kepolaran sangat rendah seperti *hexane* sampai yang paling kurang non-polar seperti kloroform dan *dichloromethane*. Contoh pelarut non-polar adalah *cyclohexane*, *hexane*, *toluene*, *benzene*, *ether*, *chloroform* dan *ethyl acetate* yang saat ini digunakan untuk ekstraksi *alkaloids*, *coumarins*, asam lemak, *flavonoids*, dan *terpenoids*. Sebaliknya, untuk komponen yang bersifat hidrofilik, pelarut yang dipilih adalah pelarut polar seperti aseton, acetonitrile, butanol, propanol, dan etanol. Pelarut polar biasa digunakan untuk ekstraksi *flavonols*, *lectins*, *alkaloids*, *quassinoids*, *flavones*, *polyphenols*, *tannins*, dan *saponins*.⁴⁵

Tabel 2.1 Contoh-contoh pelarut ekstraksi⁴³

<i>Water</i>	<i>Ethanol</i>	<i>Methanol</i>	<i>Chloroform</i>	<i>Ether</i>	<i>Acetone</i>
<i>Anthocyanins</i>	<i>Tannins</i>	<i>Anthocyanins</i>	<i>Terpenoids</i>	<i>Alkaloids</i>	<i>Phenol</i>
<i>Starches</i>	<i>Polyphenols</i>	<i>Terpenoids</i>	<i>Flavonoids</i>	<i>Terpenoids</i>	<i>Flavonols</i>
<i>Tannins</i>	<i>Polyacetylenes</i>	<i>Saponins</i>		<i>Coumarins</i>	
<i>Saponins</i>	<i>Flavonols</i>	<i>Tannins</i>		<i>Fatty acids</i>	
<i>Terpenoids</i>	<i>Terpenoids</i>	<i>Xanthoxyllines</i>			
<i>Polypeptides</i>	<i>Steroids</i>	<i>Totarol</i>			
<i>Lectins</i>	<i>Alkaloids</i>	<i>Quassinoids</i>			
		<i>Lactones</i>			
		<i>Flavones</i>			
		<i>Phenones</i>			
		<i>Polyphenols</i>			

2.1.11 Studi *in Vivo* pada Hewan Coba

Model hewan merupakan alat yang sangat diperlukan dalam penelitian biomedis. Model hewan sudah digunakan sejak awal penemuan ilmiah dan tetap berkontribusi besar hingga saat ini dalam membantu manusia mengerti fungsi dari gen, mekanisme berbagai penyakit, dan efektivitas serta toksisitas berbagai obat maupun bahan kimia.⁴⁶ Model hewan memiliki kelebihan karena dapat dikendalikan dan dimanipulasi dimana hal ini tidak dapat dilakukan di manusia. Pada hewan coba, lebih mudah untuk mengurangi faktor-faktor yang dapat mengacaukan penelitian seperti perbedaan usia, cara pemeliharaan, diet, ataupun pengaruh lingkungan lainnya.⁴⁷

Terdapat prinsip fundamental sebagai pedoman etik dalam penelitian, pengujian, dan pembelajaran menggunakan hewan coba yaitu 3R, yang merupakan singkatan dari *replacement*, *reduction*, dan *refinement*. Prinsip ini pertama kali diperkenalkan oleh Russel dan Burch pada tahun 1959.⁴⁸ Prinsip *replacement* berarti mengganti hewan hidup tingkat tinggi dengan bahan mati. Prinsip *reduction* berarti mengurangi jumlah hewan yang digunakan untuk memperoleh informasi. Prinsip *refinement* berarti mengurangi insiden atau penderitaan dari prosedur tidak manusiawi yang dilakukan terhadap hewan coba walaupun tetap harus dilakukan.⁴⁹

Dalam penelitian dengan hewan coba, tikus merupakan salah satu model yang paling banyak digunakan. Hal ini tidak mengejutkan karena 99% gen tikus terdapat juga di manusia. Selain itu, tikus relatif tidak mahal untuk dibesarkan dan dipelihara. Tikus dapat bereproduksi secara cepat, memungkinkan peneliti mempelajari gen tertentu dalam beberapa generasi dalam kurun waktu yang masuk akal. Fisiologi dan genetika dari tikus dapat dibandingkan dengan mudah terhadap manusia. Model tikus dari banyak penyakit manusia juga telah dikembangkan untuk mempelajari patogenesis dari penyakit dan mengevaluasi efektivitas serta toksisitas dari kandidat obat.⁴⁶

Sprague Dawley merupakan galur tikus yang paling sering digunakan dalam penelitian di laboratorium. Tikus ini merupakan tikus albino *hybrid* dengan kepala yang panjang dan sempit, memiliki tingkat reproduksi yang tinggi dan insiden tumor spontan yang rendah. Cocok untuk peneliti yang sibuk karena memiliki temperamen yang tenang serta mudah untuk ditangani.⁴⁶

Hirarki taksonomi tikus *Sprague Dawley* adalah sebagai berikut:

Kingdom : Animalia

Filum: Chordata

Subfilum: Vertebrata

Kelas: Mamalia

Ordo: Rodentia

Famili: Muridae

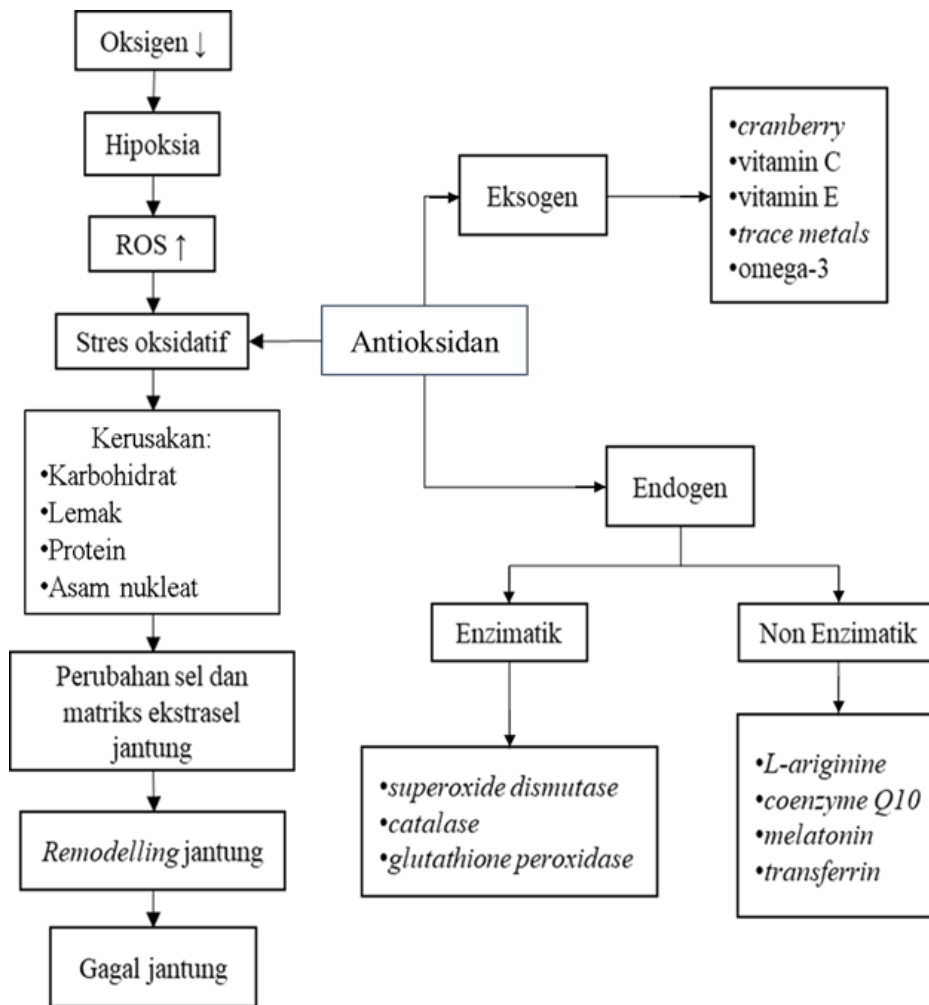
Sub-famili: Murinae

Genus: *Rattus*

Spesies: *Rattus norvegicus*

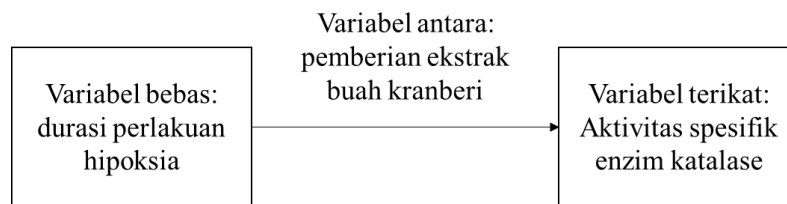
Galur/Strain: *Sprague Dawley*⁵⁰

2.2 Kerangka Teori



Gambar 2.4 Kerangka teori

2.3 Kerangka Konsep



Gambar 2.5 Kerangka konsep

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian dilakukan untuk menguji efek pemberian ekstrak buah kranberi terhadap produksi antioksidan hewan coba yang diinduksi hipoksia sistemik kronik menggunakan desain eksperimental. Penelitian dilakukan secara *in vitro* yang terdiri dari uji fitokimia, uji kapasitas total antioksidan dengan larutan DPPH, uji kadar fenolik total, uji kadar alkaloid total, dan uji BSLT untuk mengetahui toksisitas, serta secara *in vivo* untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak buah kranberi terhadap aktivitas spesifik enzim katalase organ jantung dan darah tikus *Sprague Dawley* yang diinduksi hipoksia, dan pemeriksaan patologi anatomi.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Tarumanagara, Jl. Letjen S. Parman No.1, Grogol, Jakarta Barat. Penelitian ini berlangsung dalam kurun waktu 5 bulan, mulai dari bulan Januari 2019 sampai dengan Mei 2019

3.3 Sampel Penelitian

3.3.1 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah kranberi (*Vaccinium macrocarpon Aiton*) yang diimpor dari Amerika oleh CV. Tekno Boga Mandiri dan identifikasi buah dilakukan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Pusat Penelitian Biologi, Cibinong *Science Center*, Jl. Raya Jakarta – Bogor KM 46 Cibinong 16911.

3.3.2 Hewan Percobaan

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus *Sprague Dawley* jantan dengan berat sekitar 180-350 gram, berumur 10-12 minggu, sehat serta berperilaku aktif yang didapatkan dari Laboratorium hewan coba, Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbangkes dan dilakukan uji toksisitas *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) di Laboratorium Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Tarumanagara, Jl. Letjen S. Parman No.1, Grogol, Jakarta Barat.

3.4 Perkiraan Besar Sampel

Penentuan besar sampel tikus pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan rumus Federer⁵¹, yaitu:

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

dengan t merupakan jumlah perlakuan dan n merupakan banyak sampel pada setiap kelompok perlakuan.

Pada penelitian ini akan dilakukan 8 perlakuan, sehingga dengan menggunakan rumus diatas, didapatkan hasil sebagai berikut:

$$(8-1)(n-1) \geq 15$$

$$7(n-1) \geq 15$$

$$7n - 7 \geq 15$$

$$7n \geq 15+7$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,14$$

$$n = 4$$

Berdasarkan perhitungan di atas, jumlah tikus yang digunakan untuk setiap kelompok perlakuan adalah 4 ekor, sehingga jumlah tikus total dalam penelitian ini untuk 8 kelompok adalah 32 ekor. Tikus dibagi kedalam dua kelompok besar, yaitu kelompok uji yang dicekok dengan ekstrak buah kranberi dan kelompok kontrol yang tidak dicekok dengan ekstrak buah kranberi. Masing-masing kelompok dibagi kembali berdasarkan lamanya perlakuan hipoksia menjadi sebagai berikut:

- kelompok uji dalam kondisi normoksia
- kelompok uji dengan perlakuan hipoksia selama 1 hari
- kelompok uji dengan perlakuan hipoksia selama 7 hari
- kelompok uji dengan perlakuan hipoksia selama 14 hari
- kelompok kontrol dalam kondisi normoksia
- kelompok kontrol dengan perlakuan hipoksia selama 1 hari
- kelompok kontrol dengan perlakuan hipoksia selama 7 hari
- kelompok kontrol dengan perlakuan hipoksia selama 14 hari

3.5 Cara Kerja / Prosedur Kerja Penelitian

3.5.1 Pengambilan Sampel

Sampel kranberi didapatkan dari CV. Tekno Boga Mandiri yang beralamat di Jalan Meruya Ilir Gang Mawar, Srengseng, Kembangan, Jakarta Barat 11630 selaku pengimpor langsung dari Amerika.

3.5.2 Identifikasi Tanaman

Sampel yang telah didapatkan, dikirim ke LIPI (Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia), Pusat Penelitian Biologi, Cibinong untuk diidentifikasi untuk diketahui spesiesnya, kemudian didapatkan bahwa spesies dari sampel adalah *Vaccinium macrocarpon Aiton*.

3.5.3 Pembuatan Ekstrak

Sampel dicuci bersih dan ditimbang. Setelah itu, dipotong tipis-tipis dan dikeringkan selama kurang lebih 7 hari di atas nampan dengan dibalik setiap harinya. Sampel yang sudah kering, dibuat bentuk simplisia dengan cara dihancurkan menggunakan *blender*. Kemudian simplisia ditimbang kembali. Digunakan metode maserasi dengan pelarut etanol untuk proses ekstraksi. Maserasi diaduk setiap pagi dan sore hari dan ditampung setiap dua hari sekali. Penampungan dilakukan sebanyak 3 kali. Hasil dari ekstraksi yang telah ditampung kemudian dievaporasi menggunakan alat *rotary evaporator* untuk menarik pelarut etanol dari sampel. Sampel yang telah dievaporasi akan menjadi bentuk pasta dan siap digunakan dalam pengujian.

3.5.4 Uji Fitokimia⁵²

3.5.4.1 Deteksi *Alkaloid* dengan Uji Mayer

Ekstrak kranberi sebanyak 15 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan kloroform sebanyak 10 mL. Lalu, 5 mL dari campuran tersebut dipindahkan ke tabung reaksi lain, ditambahkan 3 tetes amonia, dan dikocok sampai rata. Setelah itu 5 mL asam sulfat (H_2SO_4) ditambahkan ke dalam tabung dan didiamkan sampai terbentuk lapisan. Lapisan bagian atas yang terbentuk diambil dengan pipet dan dipindahkan ke tabung reaksi lain. Ditambahkan reagen Mayer setetes demi setetes hingga maksimal 2 mL. Hasil positif (+) ditandai dengan terbentuk endapan hijau.

3.5.4.2 Deteksi *Phenols*

Ekstrak kranberi sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 2 mL air suling, 0.5 mL Natrium Karbonat (Na_2CO_3), dan 0.5 mL reagen *Folin Ciocalteau* dengan pipet *Mohr*. Hasil positif (+) ditandai dengan terbentuk warna biru atau hijau.

3.5.4.3 Deteksi *Anthocyanin* dan *Betacyanin*

Ekstrak kranberi sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 1 mL NaOH 2N dan dipanaskan pada suhu $100^\circ C$ selama 5 menit dengan penangas. Hasil positif (+) *anthocyanin* ditandai dengan terbentuk warna hijau kebiruan dan positif (+) *betacyanin* terbentuk warna kuning.

3.5.4.4 Deteksi *Cardio Glycosides*

Ekstrak kranberi sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 2 mL asam asetat glasial dan beberapa tetes $FeCl_3$ 5%. Lalu asam sulfat pekat (H_2SO_4) ditambahkan sebanyak 1 mL. Hasil positif (+) ditandai dengan terbentuk cincin coklat.

3.5.4.5 Deteksi *Coumarins*

Ekstrak kranberi sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditutup dengan kertas saring yang sudah dibasahi NaOH 1N. Tabung reaksi kemudian ditempatkan di air mendidih selama beberapa menit. Kertas saring yang sebelumnya menutup tabung reaksi diperiksa dibawah sinar UV. Hasil positif (+) ditandai dengan terbentuk fluoresensi kuning.

3.5.4.6 Deteksi *Flavonoids*

Ekstrak kranberi sebanyak 3 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 4 mL NaOH 1N. Hasil positif (+) ditandai dengan terbentuk warna kuning gelap.

3.5.4.7 Deteksi *Glycosides*

Ekstrak kranberi sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian 3 mL kloroform dan 1 mL larutan amonium 10% ditambahkan ke dalam tabung reaksi tersebut. Hasil positif (+) ditandai dengan terbentuk warna merah muda.

3.5.4.8 Deteksi *Quinones*

Ekstrak kranberi sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian asam sulfat (H_2SO_4) ditambahkan ke dalam tabung reaksi tersebut. Hasil positif (+) ditandai dengan terbentuk warna merah.

3.5.4.9 Deteksi *Steroids*

Ekstrak kranberi sebanyak 0.5 mg ditambahkan dengan 1 mL kloroform selanjutnya dibiarkan mengering pada udara bebas. Kemudian ditambahkan 1 mL asam asetat glasial, diaduk sampai rata, dan ditetesi sebanyak satu sampai dua tetes asam sulfat (H_2SO_4). Hasil positif (+) ditandai dengan terbentuk warna biru kehijauan.

3.5.4.10 Deteksi *Terpenoids*

Ekstrak kranberi sebanyak 0.5 mg ditambahkan dengan 1 mL kloroform selanjutnya dibiarkan mengering pada udara bebas. Kemudian ditambahkan 1 mL asam asetat glasial, diaduk sampai rata, dan ditetesi sebanyak satu sampai dua tetes asam sulfat (H_2SO_4). Hasil positif (+) ditandai dengan terbentuk cincin berwarna merah kecoklatan.

3.5.4.11 Deteksi *Tannins*

Ekstrak kranberi sebanyak 0.5 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Tabung reaksi tersebut dipanaskan dalam 20 mL air suling dan difiltrasi. 1 mL ekstrak yang telah dipanaskan diambil dan dipindahkan ke dalam tabung reaksi lain. Setelah itu tambahkan dengan $FeCl_3$ 5%. Hasil positif (+) ditandai dengan terbentuk warna hijau kecoklatan.

3.5.5 Pengukuran Kapasitas Total Antioksidan dengan Larutan DPPH (Blois)⁵³

3.5.5.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum dan Absorbansi Kontrol DPPH

Sebanyak 1.97 mg DPPH diambil dan ditambahkan dengan metanol hingga 100 mL dalam labu ukur sehingga konsentrasi DPPH menjadi 50 μM . Kemudian diambil 3.8 mL dari DPPH 50 μM tersebut dan ditambahkan dengan 0.2 mL metanol, dikocok merata, dan didiamkan dalam ruang gelap selama 30 menit. Setelah 30 menit, larutan dibaca pada mesin spektrofotometer UV-Vis dan didapatkan panjang gelombang maksimum serta absorbansi kontrol pada kisaran panjang gelombang 400 – 800 nm.

3.5.5.2 Uji Ekstrak

Sebanyak 10 mg ekstrak kranberi ditambahkan dengan metanol hingga 10 mL dalam labu ukur sehingga didapat konsentrasi 1 mg/mL. Selanjutnya diambil dari labu ukur tersebut masing-masing 0.25 mL, 0.75 mL, 1.25 mL, 1.75 mL, dan 2.25 mL ke 5 buah labu ukur ukuran 25 mL. Kelima labu ukur tersebut ditambahkan metanol hingga 25 mL sehingga didapatkan konsentrasi masing-masing 10 $\mu g/mL$, 30 $\mu g/mL$, 50 $\mu g/mL$, 70

$\mu\text{g/mL}$, dan $90 \mu\text{g/mL}$. Dari masing-masing labu ukur, diambil 0.2 mL larutan dan dipindahkan ke tabung reaksi. Setiap tabung reaksi ditambahkan dengan $3.8 \text{ mL DPPH } 50 \mu\text{M}$, dikocok hingga merata, dan didiamkan dalam ruang gelap selama 30 menit. Larutan ekstrak kemudian dibaca absorbansinya dengan alat spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum yang telah didapatkan dari serapan optimal DPPH. Langkah pembuatan larutan sampel dan pembacaan absorbansi dilakukan sebanyak 2 kali (duplo) dan diambil rata-rata.

3.5.5.3 Larutan Pembanding: Asam Askorbat

Larutan stok asam askorbat dibuat dengan mengambil 0.01 gram bubuk asam askorbat ditambahkan metanol hingga 100 mL dalam labu ukur sehingga didapatkan konsentrasi $100 \mu\text{g/mL}$. Dari stok diambil masing-masing 0.2 mL , 0.4 mL , 0.6 mL , 0.8 mL , dan 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Masing-masing tabung reaksi ditambahkan metanol sampai 10 mL sehingga didapatkan konsentrasi $2 \mu\text{g/mL}$, $4 \mu\text{g/mL}$, $6 \mu\text{g/mL}$, $8 \mu\text{g/mL}$ dan $10 \mu\text{g/mL}$. Setiap tabung reaksi selanjutnya diletakkan diatas alat *vortex* hingga larutan tercampur secara merata dan ditambahkan dengan 3.5 mL larutan DPPH $50 \mu\text{M}$. Masing-masing tabung reaksi diletakkan diatas alat *vortex* kembali agar tercampur merata. Setelah tercampur merata, seluruh tabung reaksi ditutup ujungnya dengan *aluminium foil* dan didiamkan selama 30 menit pada ruang gelap. Selanjutnya, larutan dari setiap tabung reaksi dibaca absorbansinya menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah didapatkan dari serapan optimal DPPH.

3.5.5.4 Perhitungan Hasil Uji Kapasitas Total Antioksidan

Absorbansi yang didapat pada pengukuran panjang gelombang maksimum larutan DPPH dinyatakan sebagai absorbansi kontrol. Absorbansi yang didapat dari larutan uji dinyatakan sebagai absorbansi uji. Dengan didapatkannya absorbansi blanko dan uji, nilai % inhibisi dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi Kontrol} - \text{Absorbansi Uji}}{\text{Absorbansi Kontrol}} \times 100\%$$

Nilai % inhibisi yang didapat digunakan untuk membuat kurva persamaan linear yang selanjutnya digunakan untuk mendapatkan nilai IC₅₀ yaitu dosis sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50% radikal bebas DPPH.

3.5.6 Pengukuran Kadar Fenolik Total (Singleton & Rossi)⁵⁴

3.5.6.1 Pembuatan Larutan Standar *Tannin*

Sebanyak 0.25 gram *tannin* sebagai standar diambil dan diencerkan dengan 5 mL metanol 95% pada gelas beker. Kemudian ditambahkan akuades hingga 50 mL sehingga didapat konsentrasi 5 mg/mL. Larutan tersebut diambil 0.6 mL, 0.8 mL, 1 mL, 1.2 mL, dan 1.4 mL, lalu diencerkan hingga 10 mL dengan akuades pada labu ukur 10 mL sehingga konsentrasi larutan pada masing-masing labu ukur adalah 300 µg/mL, 400 µg/mL, 500 µg/mL, 600 µg/mL, dan 700 µg/mL. 0.2 mL dari masing-masing larutan diambil dan dimasukkan ke dalam 5 tabung reaksi, lalu ditambah 15.8 mL akuades dan 1 mL reagen *Folin Ciocalteu*, dan dikocok sampai rata. Tabung reaksi selanjutnya diletakkan pada ruang gelap dan didiamkan selama 8 menit. Setelah 8 menit, 3 mL Na₂CO₃ ke masing-masing tabung reaksi dan dikocok kembali hingga merata. Tabung reaksi kembali diletakkan pada ruang gelap dan didiamkan selama 2 jam. Setiap larutan kemudian dibaca absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 756 nm. Dari absorbansi yang didapat, dibuat kurva linear sebagai kurva standar tannin.

3.5.6.2 Uji Ekstrak

Sebanyak 0.3 gram ekstrak ditambahkan hingga 10 mL dengan larutan metanol – air yang memiliki perbandingan 1 : 1 pada labu ukur 10 mL. Larutan tadi diambil 0.2 mL dan dipindahkan ke tabung reaksi, selanjutnya ditambahkan 15.8 mL akuades dan 1 mL reagen *Folin*

Ciocalteau. Tabung reaksi didiamkan dalam ruang gelap selama 8 menit, kemudian ditambahkan dengan 3 mL Na_2CO_3 20% dan dikocok. Selanjutnya kembali didiamkan dalam ruang gelap selama 2 jam. Larutan dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 765 nm. Nilai absorbansi yang didapat dimasukkan ke kurva standar tannin untuk mendapatkan konsentrasi fenolik.

3.5.7 Pengukuran Kadar Alkaloid total (Trivedi, dkk.)⁵⁵

3.5.7.1 Pembentukan Stok Larutan *Berberin Chloride*

Sebanyak 1 mg bubuk *berberine chloride* dilarutkan dengan 10 mL metanol dan dimasukkan ke dalam labu ukur.

3.5.7.2 Pembuatan Larutan Standar

Larutan *berberine chloride* diambil sebanyak 0.2 mL, 0.4 mL, 0.6 mL, 0.8 mL, dan 1 mL dari stok sehingga didapatkan konsentrasi 20 $\mu\text{g/mL}$, 40 $\mu\text{g/mL}$, 60 $\mu\text{g/mL}$, 80 $\mu\text{g/mL}$, dan 100 $\mu\text{g/mL}$, kemudian masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya 5 mL dapar fosfat dan 5 mL *Bromocresol Green* (BCG) ditambahkan ke setiap tabung. Larutan kemudian dipindahkan ke labu pemisah dan ditambah 5 mL kloroform. Labu pemisah ditutup, dikocok kuat, dan didiamkan sampai terbentuk dua lapisan. Lapisan bawah yang tidak terdapat endapan ditampung ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan kloroform hingga batas garis 10 mL. Salah satu larutan dalam tabung diambil untuk dibaca panjang gelombang maksimalnya, kemudian setiap larutan dibaca absorbansinya dengan panjang gelombang maksimal yang telah didapat sebelumnya dengan alat spektrofotometer. Selanjutnya, dibuat kurva standar sehingga diperoleh persamaan linier.

3.5.7.3 Pembuatan Larutan Sampel

Ekstrak kranberi diambil masing-masing sebanyak 50 mg dan dimasukkan ke tabung reaksi. 3 mL HCl 2N, 5 mL dapar fosfat pH 4.7, dan 5 mL BCG ditambahkan ke dalamnya. Larutan kemudian dimasukkan ke dalam tabung pemisah dan ditambahkan dengan 5 mL kloroform. Tabung dikocok sampai merata dan didiamkan hingga terbentuk dua lapisan. Lapisan bagian bawah yang tidak terdapat endapan diambil dan ditampung ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan kloroform hingga batas garis 10 mL pada labu ukur. Larutan sampel kemudian dibaca dengan alat spektrofotometer pada panjang gelombang maksimal yang sebelumnya telah didapat. Langkah pembuatan larutan sampel dan pembacaan absorbansi dilakukan sebanyak 2 kali (duplo) dan diambil rata-rata. Selanjutnya, kadar alkaloid dihitung berdasarkan persamaan linier yang telah didapat dari kurva standar.

3.5.8 Pengukuran Toksisitas dengan Metode BSLT (Meyer)⁵⁶

3.5.8.1 Penetasan *Artemia salina*

Sebanyak 10 mg telur udang *Artemia salina* dimasukkan ke tabung *erlenmeyer* dan ditambahkan 250 mL air laut. Kemudian aerator digunakan sebagai sumber udara dan lampu digunakan untuk menjaga kehangatan. Selanjutnya ditunggu 2 x 24 jam sampai telur menetas.

3.5.8.2 Pembuatan Ekstrak Sampel

Sebanyak 20 mg ekstrak kranberi ditempatkan pada gelas beker dan diencerkan dengan 10 mL air laut. Selanjutnya dilakukan proses homogenasi menggunakan alat *vortex* sehingga didapat konsentrasi 2000 µg/mL. Larutan *tween* 80% digunakan untuk mempermudah proses homogenasi.

3.5.8.3 Uji Toksisitas

Larva udang *Artemia salina* sebanyak 10 ekor dimasukkan ke dalam tabung reaksi dimana terdapat 5 buah tabung reaksi sehingga total 50 ekor larva udang yang digunakan. Sebanyak 1000 μL , 500 μL , 100 μL , 10 μL , dan 0 μL ekstrak sampel diambil dan dimasukkan ke dalam 5 tabung reaksi. Ekstrak 500 μL , 100 μL , 10 μL , dan 0 μL secara berurutan ditambahkan dengan 500 mL, 900 mL, dan 990 mL air laut. Kemudian, 5 tabung reaksi berisi sampel dimasukkan ke dalam 5 tabung reaksi berisi larva udang *Artemia salina*. Selanjutnya, masing-masing tabung reaksi dibiarkan selama 24 jam di bawah lampu. Setelah 24 jam, jumlah larva udang yang mati dihitung. Seluruh langkah pengujian dilakukan sebanyak 2 kali (duplo) dan hasil yang didapat diambil rata-ratanya.

Kurva kolerasi antara logaritma konsentrasi sampel dengan angka kematian larva dibuat, kemudian persamaan linier dihitung. Persamaan linier lalu digunakan untuk menghitung *Lethality Concentration 50* (LC_{50}) yang merupakan nilai 50% probit, yaitu konsentrasi sampel yang mampu mematikan 50% total larva udang. Dalam persamaan linier, nilai x dianggap sebagai konsentrasi ekstrak dan nilai y dianggap sebagai nilai 50% probit. $LC_{50} < 20 \mu\text{g/mL}$ berarti sangat toksik, $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ berarti toksik, dan $LC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ berarti tidak toksik.

3.5.9 Perlakuan pada Hewan Coba

3.5.9.1 Pembagian Kelompok Tikus

Sebanyak 32 ekor tikus dibagi ke dalam dua kelompok besar dua kelompok besar yaitu kelompok uji yang dicekok dengan ekstrak buah kranberi dan kelompok kontrol yang tidak dicekok dengan ekstrak buah kranberi. Masing-masing kelompok dibagi kembali berdasarkan lamanya perlakuan hipoksia yaitu normoksia, hipoksia 1 hari, hipoksia 7 hari, dan hipoksia 14 hari.

3.5.9.2 Sungkup Hipoksia

Serbuk kayu, tempat minum, dan tempat makan tikus diletakkan dalam sungkup. Kipas dinyalakan dan saluran pembuangan CO₂ dihubungkan dengan selang ke labu *erlenmeyer* yang sebelumnya telah diisi *soda lime*. Sungkup dialirkan gas sebanyak 5 L/menit terlebih dahulu sebelum dimasukkan tikus, selanjutnya diturunkan menjadi 1.5 L/menit setelah tikus dimasukkan. Serbuk kayu diganti secara berkala dan diperiksa timbulnya gelembung pada *soda lime*.

3.5.9.3 Hipoksia Tikus

Sebelum dimasukkan ke dalam sungkup, tikus ditimbang dan ditandai dengan spidol. Selanjutnya sungkup dialiri gas dengan konsentrasi 10% oksigen dan 90% nitrogen. Makanan dan minuman tikus diberikan setiap hari, serbuk kayu diganti jika sudah kotor, dan gas diganti jika sudah habis.

3.5.9.4 Cekok

Setelah tikus dihipoksia sesuai lama waktu dari setiap kelompok, tikus dikeluarkan dan ditimbang. Selanjutnya dipindahkan ke dalam kandang. Tikus dicekok selama 14 hari dimana setiap hari dilakukan 2 kali pencekokan setiap pk 06.30 dan pk 14.30 dengan dosis 1 mL setiap pencekokan. Sebanyak 4 gram ekstrak kranberi diencerkan dengan 100 mL NaCl sehingga didapatkan larutan dengan konsentrasi 40 mg/mL untuk pencekokan. Dosis pencekokan per hari adalah 80 mg/mL.

3.5.10 Pengambilan Organ Jantung dan Darah Tikus

Alat bedah dipersiapkan sehari sebelum tindakan bedah dan direndam dengan alkohol 90% semalaman. Setelah durasi pencekokan tikus selesai, tikus dianestesi intraperitoneum dengan campuran *xylazine* 0.2 mL dan *ketamine* 0.4 mL. Tikus ditunggu hingga tidak sadarkan diri dan ditimbang berat badannya. Selanjutnya, tikus diletakkan diatas *styrofoam* beralaskan plastik sebagai alas bedah dan difiksasi dengan lakban. Tindakan antiseptik dilakukan dengan alkohol 70%

pada bagian yang akan dilakukan sayatan. Pembedahan diawali dengan bagian abdomen tikus dijepit dan digunting, kemudian dilanjutkan dengan pengguntingan secara vertikal ke arah toraks sampai bagian toraks terbuka dan organ terlihat dengan jelas. Dengan segera, darah diambil dari apeks jantung dengan spuit dan dimasukkan ke tabung *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA). Selanjutnya, organ jantung ditarik dengan pinset, digunting, dan diletakkan diatas cawan arloji. Jantung dan darah tikus dipastikan tetap dalam kondisi dingin dengan diletakkan pada gelas beker berisi es. Organ jantung ditimbang dan kemudian dimasukkan ke dalam plastik klip. Setelah organ jantung dan darah selesai diambil, tikus dijahit kembali.

3.5.11 Pembuatan Homogenat Organ Jantung Tikus

Organ jantung dipotong dan ditimbang seberat 0.1 gram. Selanjutnya dimasukkan ke dalam *microtube*. Larutan dapar fosfat 0.1 M pH 7.2 sebanyak 500 μ L dimasukkan ke dalam *microtube* menggunakan *micropipete*. Organ jantung kemudian dihaluskan dengan alat *tissue grinder* (*homogenizer*). Setelah homogen, ditambahkan lagi sebanyak 500 μ L dapar fosfat 0.1 M pH 7.2 dan dihaluskan kembali. Homogenat kemudian disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 6000 rpm. Setelah endapan terpisah pada bagian bawah, supernatan diambil menggunakan *micropipette* dan dipindahkan ke *microtube* lain.

3.5.12 Pembuatan Lisat 50%

Tabung EDTA yang telah berisi sampel darah tikus ditandai batas atasnya. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 8000 rpm sampai terbentuk endapan. Plasma yang terpisah dari endapan ditampung. Kemudian, sisa darah dalam tabung EDTA ditambahkan larutan dapar fosfat 0.1 M pH 7.2 hingga garis batas yang telah ditandai sebelumnya dan dikocok hingga merata. Lalu, tabung EDTA berisi sampel darah disentrifugasi kembali dan setelah selesai supernatannya dibuang. Langkah penambahan dapar fosfat hingga supernatan dibuang diulangi sampai tiga kali. Setelah 3 kali, tabung EDTA berisi sampel darah ditambah akuabides dingin hingga garis batas yang telah ditandai sebelumnya dan dikocok hingga merata. Hasil lisat 50% siap dipakai untuk pemeriksaan selanjutnya.

3.5.13 Pengukuran Aktivitas Spesifik Enzim Katalase (Maté)⁵⁷

3.6.13.1 Pembuatan Hidrogen Peroksida (H₂O₂)

Larutan H₂O₂ dibuat dengan mencampurkan 0.025 mL 30% H₂O₂ dengan dapar fosfat salin hingga 100 mL (perbandingan 1 : 4000) sehingga didapat konsentrasi 27.203 mM.

3.5.13.2 Optimasi Waktu dan Pengenceran

Didapatkan optimasi waktu dan pengenceran melalui pengukuran larutan uji dan blanko pada panjang gelombang 210 nm. Untuk optimasi supernatan organ jantung, dibuat pengenceran 5x, 10x, 25x, 50x dan 100x dengan larutan PBS pH 7 0.05M. Untuk optimasi lisat 50% darah, dibuat dengan dibuat pengenceran 200x dengan akuades yang selanjutnya ditandai sebagai stok. Dari stok lisat 50% darah dibuat pengenceran 10x, 25x, 50x, 100x.

Untuk pembuatan larutan blanko, sebanyak 950µL larutan dapar fosfat salin 0.05 M pH 7 dicampur dengan 50 µL H₂O₂ selama 45 detik, kemudian dibaca pada spektrofotometer dan dilakukan pencatatan absorbansinya setiap 1 menit selama 10 menit. Pada pembuatan larutan uji, sebanyak 50 µL supernatan homogenat jantung dicampur dengan 950 µL

H₂O₂ selama 45 detik, kemudian dibaca pada spektrofotometer dan dilakukan pencatatan absorbansinya setiap 1 menit selama 10 menit. Absorbansi yang diperoleh dihitung kecepatan reaksinya (Δv) dan didapatkan aktivitas enzim katalase tertinggi.

3.5.13.3 Pembuatan Kurva Standar Protein dengan Metode Warburg – Christian⁵⁸

Pengenceran *Bovine Serum Albumin* (BSA) dilakukan sehingga didapatkan larutan dengan konsentrasi 0.025 mg/mL, 0.05 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.6 mg/mL dan 0.8 mg/mL. Absorbansi dari masing-masing larutan selanjutnya dibaca dengan alat spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm. Absorbansi yang didapat dari pembacaan kemudian dimasukkan ke dalam grafik sehingga didapatkan persamaan linier. Persamaan linier selanjutnya digunakan untuk menghitung kadar protein sampel.

3.5.13.4 Pengukuran Kadar Protein Sampel

Supernatan organ jantung dibuat pengenceran 100x dengan larutan PBS 0.05 M pH 7 sedangkan stok lisat 50% darah dibuat pengenceran 10x dengan akuades. Selanjutnya kadar protein sampel diukur dengan melakukan pembacaan absorbansi pada panjang gelombang 280 nm dengan alat spektrofotometer sesuai rentang absorbansi larutan standar BSA dari sampel yang telah dilakukan optimasi pengenceran sebelumnya. Absorbansi kemudian dimasukkan ke dalam persamaan linier yang didapat dari kurva standar BSA dengan y adalah absorbansi dan x adalah kadar protein sampel yang diuji.

3.5.13.5 Pengujian Aktivitas Enzim Katalase

Digunakan absorbansi uji dan absorbansi blanko yang didapat dari pengukuran sebelumnya. Selanjutnya, ditentukan aktivitas enzim katalase (U/mL) dengan rumus :

$$\text{Aktivitas Katalase (U/mL)} = \frac{(\Delta\text{Absorbansi Uji} - \Delta\text{Absorbansi Blanko}) / \text{menit}}{(\text{Molaritas H}_2\text{O}_2 \times (\text{Volume Sampel yang diukur}))} \times \text{Faktor Pengenceran}$$

Perhitungan aktivitas enzim katalase selanjutnya digunakan untuk menghitung aktivitas spesifik enzim katalase (U/mg) ditentukan dengan rumus :

$$\text{Aktivitas Spesifik Katalase (U/mg)} = \frac{\text{Aktivitas Katalase (U/mL)}}{\text{Kadar Protein dalam Sampel (mg/mL)}}$$

3.5.14 Pemeriksaan Patologi Anatomi Jantung

3.5.14.1 Pembuatan Blok Parafin

Pembuatan sediaan patologi anatomi diawali dengan dibuat potongan jaringan dengan ketebalan sekitar 2 mm, dibungkus dengan kertas saring jika ukuran jaringan kecil, dan direndam dengan formalin 10% selama 2 jam. Setelah 2 jam, jaringan diangkat dan dicuci dengan air mengalir untuk dihilangkan sisa formalinnya. Selanjutnya, jaringan dimasukkan ke dalam alkohol 70%, 80%, dan 96% secara berturut-turut masing-masing 15 menit. Dari alkohol 96%, jaringan diletakkan di kertas saring terlebih dahulu dan ditekan agar sisa alkohol terserap kertas saring. Berikutnya, jaringan dipindahkan ke dalam aseton sebanyak tiga kali masing-masing selama 15 menit, dan dikeringkan kembali dengan cara ditekan dengan kertas saring. Kemudian, jaringan dimasukkan ke dalam benzol sebanyak dua kali masing-masing selama 15 menit. Dari benzol, jaringan dimasukkan ke dalam oven berisi parafin cair hingga terendam pada temperatur 90° C selama 2 jam. Setelah 2 jam, parafin cair dituangkan ke dalam cetakan besi berbentuk huruf L dan didiamkan sampai mengeras. Setelah mengeras, jaringan dipotong tipis dengan menggunakan mikrotom dan diletakkan dalam *water bath* pada suhu ruang selama kurang dari 30 detik. Selanjutnya, jaringan diletakkan diatas *object glass* dan dikeringkan dengan lempeng pemanas pada suhu 40° C selama 10 menit. Jika sudah kering, diberi pewarnaan HE (*Hematoxylin-Eosin*).

3.5.14.2 Pewarnaan dengan *Hematoxylin-Eosin*

Jaringan yang sudah kering dicelupkan ke dalam alkohol 96%, 80%, dan 70% secara berturut-turut masing-masing satu kali. Kemudian jaringan diangkat dan direndam pada *hematoxylin* selama 5 menit. Setelah 5 menit, dicuci dengan air mengalir dengan posisi naik dan turun sampai bersih. Selanjutnya dicelupkan ke dalam litium karbonat sebanyak satu kali, diangkat, dan direndam pada *eosin* selama 5 menit. Setelah 5 menit, diangkat dan dicelupkan ke dalam alkohol 96% sebanyak 10 kali, selanjutnya dipindahkan ke dalam alkohol 96% pada gelas lain dan dicelupkan kembali sebanyak 10 kali. Setelah itu, dicelupkan ke dalam campuran xilol-alkohol dengan perbandingan 50 : 50, lalu dilanjutkan dengan dicelup ke dalam tiga gelas berisi xilol secara bergantian masing – masing 10 kali.

Setelah prosedur selesai, permukaan *object glass* yang tidak terdapat jaringan dilap. Permukaan yang terdapat jaringan ditetaskan dengan *enthelan (cadada balsm)*, dan ditutup dengan kaca penutup. Sediaan selanjutnya diamati dibawah mikroskop cahaya.

3.6 Variabel Penelitian

3.6.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah durasi perlakuan hipoksia terhadap tikus *Sprague Dawley*.

3.6.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas spesifik enzim katalase pada organ jantung dan darah tikus *Sprague Dawley*.

3.6.3 Variabel Antara

Variabel antara dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak buah kranberi.

3.7 Definisi Operasional

3.7.1 Hipoksia

Definisi: Keadaan kurangnya oksigen dalam tubuh tikus yang dibuat dengan mengalirkan gas berkonsentrasi 10% oksigen dan 90% nitrogen ke dalam sungkup hipoksia (*hypoxia chamber*)

Cara ukur: Konsentrasi dilihat dengan mengalirkan gas melalui *oxygenmeter*

Alat Ukur: *oxygenmeter*

Hasil Ukur: Numerik

Skala Ukur: Interval

3.7.2 Katalase

Definisi: Enzim yang berfungsi sebagai antioksidan dari dalam tubuh dan bekerja melalui mekanisme penguraian hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen

Cara ukur: menggunakan metode Maté dengan alat spektrofotometer *UV-Vis*

Alat Ukur: spektrofotometer *UV-Vis*

Hasil Ukur: Numerik

Skala Ukur: Interval

3.8 Instrumen Penelitian

3.8.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah *hypoxia chamber*, timbangan (seri Pioneer, OHAUS), *digital oxygen meter* (OX-12B No.05231, MIEI Shanghai, P.R. China), *water bath* (BT-125, Hitachi, Japan), *tissue grinder* (Wheaton Science, Millville, NJ-USA), sentrifugator (Centrifuge 5424R, Eppendorf), sentrifugator (Minimax, IEC), sentrifugator (Tabletop Centrifuge PLC-03, Gemmy Industrial Corp.), spektrofotometer (Genesys 30 *Visible Spectrophotometer*, Thermo Scientific), spektrofotometer UV-Vis (Genesys 10s *UV-Vis Spectrophotometer*, Thermo Scientific), *MaxiMix vortex mixer* (Thermolyne, USA), *vacutainer* berisi EDTA, kapas, spuit steril, jarum dan benang jahit, sterofoam, *minor set* steril, *microtube* steril ukuran 1.5 mL dan 2 mL, kuvet kaca, mikrotom, *staining jar*, oven, mikroskop cahaya, alat standar laboratorium (batang pengaduk, spatula, botol

semprot, kaca arloji, gelas beker, labu ukur, labu *erlenmeyer*, pipet tetes, *micropipet*, tabung reaksi beserta rak, termometer, *stopwatch*)

3.8.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah ekstrak buah kranberi (*Vaccinium macrocarpon Aiton*), sampel jaringan jantung dan darah tikus *Sprague Dawley*, larutan FeCl_3 , larutan NaOH 10%, HCl 2N, eter, bubuk magnesium, HCl pekat, ammonia, H_2SO_4 2N, pereaksi *Meyer*, asam asetat anhidrat $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$, H_2SO_4 pekat, reagen *Folin-Ciocalteu*, kloroform, natrium karbonat (Na_2CO_3), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), asam askorbat, kuersetin, tanin, natrium nitrit (NaNO_2), natrium hidroksida (NaOH), alumunium klorida (AlCl_3), etanol, metanol, *Tween* 20, air laut, *mixed gases* (Oksigen 10%, Nitrogen 90%), *soda lime*, anestesi *xylazine HCl* dan ketamin, dinatrium hidrogen fosfat (Na_2HPO_4), kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4), natrium klorida (NaCl), *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA), hidrogen peroksida (H_2O_2) 30%, *Bovine Serum Albumin* (BSA), akuades, akuabides, formalin 10%, alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 96%, aseton, xilol, *paraffin wax*, pewarna *hematoxylin-eosin*.

3.9 Pengumpulan Data

Data dalam penelitian dikumpulkan dari uji fitokimia kualitatif ekstrak buah kranberi meliputi deteksi *alkaloids*, deteksi *phenols*, deteksi *anthocyanin* dan *betacyanin*, deteksi *cardio glycosides*, deteksi *coumarins*, deteksi *flavonoids*, deteksi *glycosides*, deteksi *quinones*, deteksi *steroids*, deteksi *terpenoids*, dan deteksi *tannins*, pengukuran kadar alkaloid total, pengukuran kadar fenolik total, pengukuran kapasitas total antioksidan dengan larutan DPPH, uji toksisitas dengan metode BSLT, pengukuran kadar enzim katalase pada organ jantung dan darah, serta pemeriksaan patologi anatomi jaringan jantung.

3.10 Analisis Data

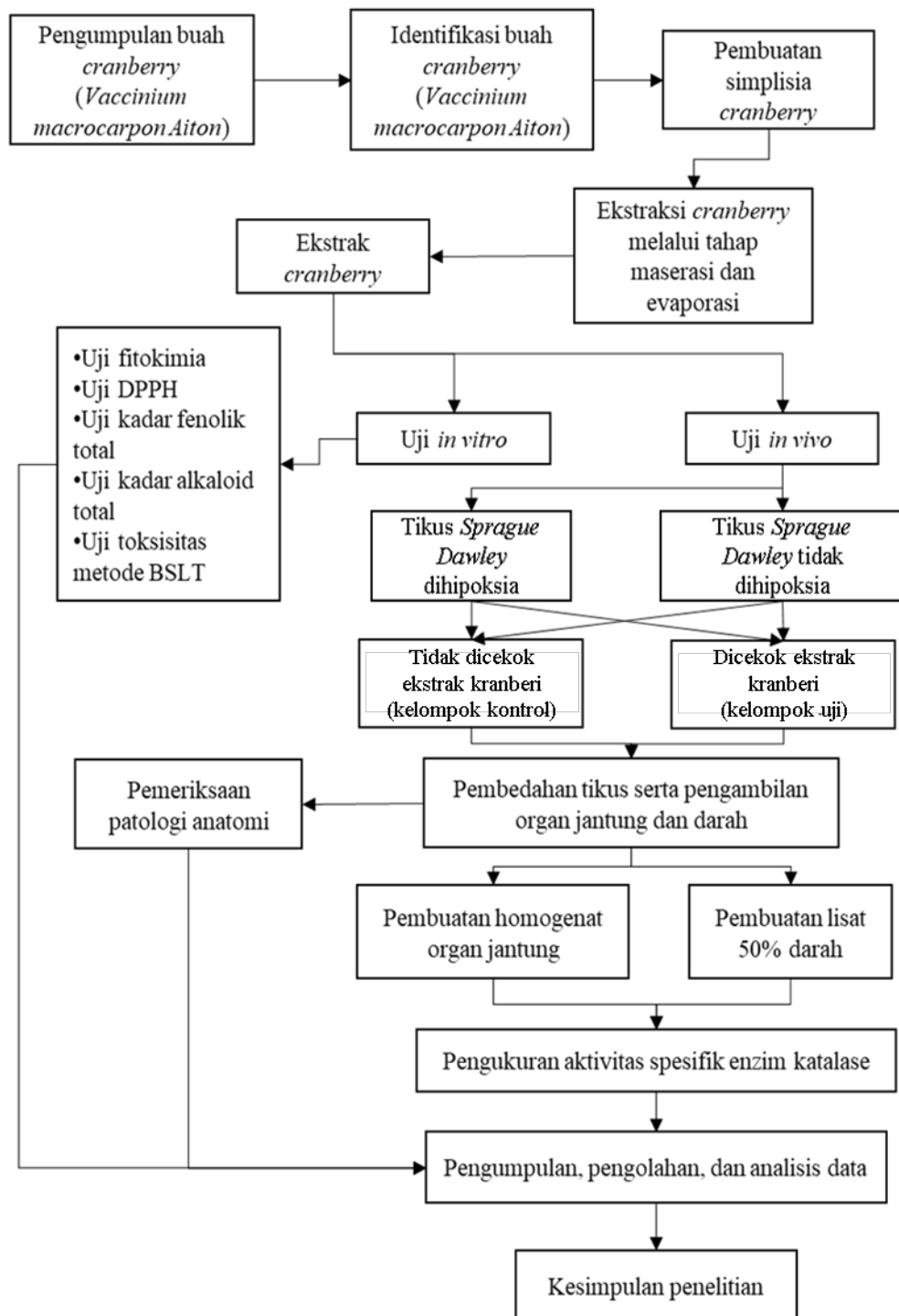
Analisis data secara statistik dilakukan dengan aplikasi *Microsoft Excel* dan *GraphPad Prism v7.04*. Data dari setiap parameter dinyatakan dalam nilai rerata (*average*) dan ditampilkan dalam bentuk tabel dan grafik. Setiap kelompok data

dilakukan uji normalitas dengan metode *Saphiro-Wilk* karena jumlah sampel kecil. Karena sebaran data normal, dilakukan uji *parametric t-test*. Studi korelasi antar dua kelompok variabel dilakukan dengan metode *Pearson Correlation Coefficient*.

3.11 Keterangan Lolos Kaji Etik

Penelitian ini merupakan bagian dari payung penelitian berjudul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Kranberi (*Vaccinium macrocarpon Aiton*) terhadap Stres Oksidatif pada organ Tikus *Sprague Dawley* (Paru, Jantung, Hati, Ginjal, dan Otak) yang Diinduksi Hipoksia” yang mendapatkan keterangan lolos kaji etik (*ethical clearance*) dengan nomor 135/KER/FK/XII/2018 dari Komisi Etik Riset Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti.

3.12 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur Penelitian

BAB 4

HASIL PENELITIAN

4.1 Uji Fitokimia

Dalam uji fitokimia, didapatkan hasil positif pada pemeriksaan *alkaloid, phenols, anthocyanin, betacyanin, cardio glycosides, coumarins, flavonoids, glycosides, quinones, steroids, terpenoids*, dan *tannins* (Tabel 4.1).

Tabel 4.1 Hasil uji fitokimia

Uji	Hasil
<i>Alkaloid</i>	+
<i>Phenols</i>	+
<i>Anthocyanin</i>	+
<i>Betacyanin</i>	+
<i>Cardio Glycosides</i>	+
<i>Coumarins</i>	+
<i>Flavonoids</i>	+
<i>Glycosides</i>	+
<i>Quinones</i>	+
<i>Steroids</i>	+
<i>Terpenoids</i>	+
<i>Tannins</i>	+

4.2 Kapasitas Total Antioksidan buah kranberi dengan Larutan DPPH (Blois)

4.2.1 Panjang Gelombang Serapan Maksimum DPPH

Panjang gelombang maksimum dan serapan DPPH didapatkan melalui pemindaian dengan spektrofotometer. Didapatkan panjang gelombang maksimum 515 nm dan absorbansi 0.514. Nilai absorbansi DPPH yang didapat dianggap sebagai absorbansi kontrol dan akan digunakan dalam rumus untuk mendapatkan % inhibisi sedangkan panjang gelombang maksimum digunakan untuk mengukur absorbansi asam askorbat dan ekstrak buah kranberi.

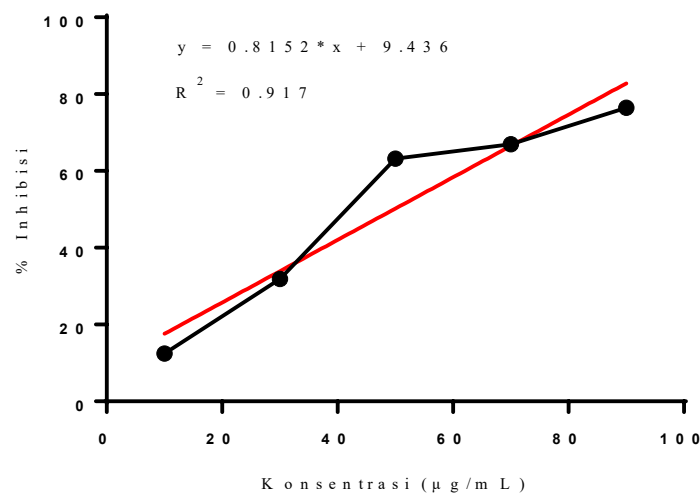
4.2.2 Uji Ekstrak Buah Kranberi

Absorbansi ekstrak buah kranberi pada setiap konsentrasi diukur dengan spektrofotometer. Selanjutnya absorbansi yang didapat dimasukkan dalam rumus untuk mendapatkan % inhibisi (Tabel 4.2).

Dari hasil yang didapat, dibuat kurva dan kemudian dihitung persamaan liniernya. Berdasarkan kurva, didapatkan persamaan linier $y = 0.8152 * x + 9.436$ dengan $R^2 = 0.917$ (Gambar 4.1). Persamaan linier yang didapat kemudian digunakan untuk menghitung *Inhibiting Concentration 50* (IC_{50}), yaitu konsentrasi sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50% DPPH. Diperoleh IC_{50} ekstrak buah kranberi sebesar $49.760 \mu\text{g/mL}$ yang mencerminkan kapasitas antioksidannya.

Tabel 4.2 Persen inhibisi berdasarkan konsentrasi dan IC_{50} ekstrak buah kranberi

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Persen Inhibisi (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
10	12.45	
30	31.91	
50	63.23	49.760
70	66.93	
90	76.46	



Gambar 4.1 Kurva persen inhibisi ekstrak buah kranberi

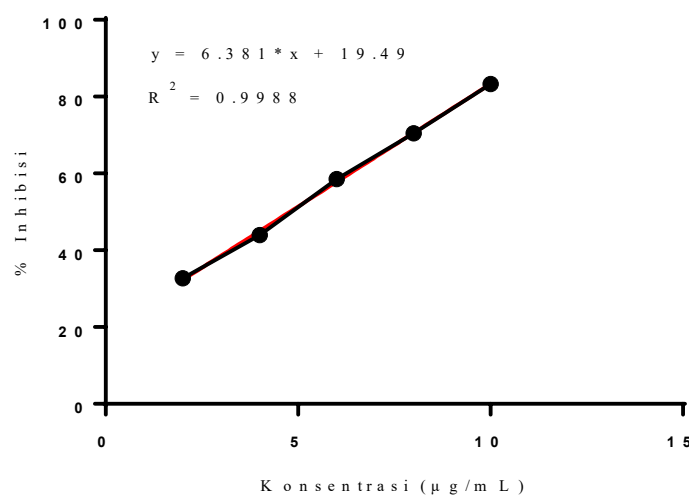
4.2.3 Larutan Perbandingan : Asam Askorbat

Absorbansi asam askorbat dari setiap konsentrasi diukur dengan spektrofotometer. Selanjutnya absorbansi yang didapat dimasukkan dalam rumus untuk mendapatkan % inhibisi (Tabel 4.3).

Dari hasil yang didapat, dibuat kurva dan kemudian dihitung persamaan liniernya. Berdasarkan kurva, didapatkan persamaan linier $y = 6.382 * x + 19.49$ dengan $R^2 = 0.9988$ (Gambar 4.2). Persamaan linier yang didapat kemudian digunakan untuk menghitung *Inhibiting Concentration 50* (IC_{50}), yaitu konsentrasi sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50% DPPH. Diperoleh IC_{50} asam askorbat sebesar $4.780 \mu\text{g/mL}$ yang mencerminkan kapasitas antioksidannya.

Tabel 4.3 Persen inhibisi berdasarkan konsentrasi dan IC_{50} asam askorbat

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Persen Inhibisi (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
2	32.68	
4	43.97	
6	58.56	4.780
8	70.43	
10	83.27	



Gambar 4.2 Kurva persen inhibisi asam askorbat

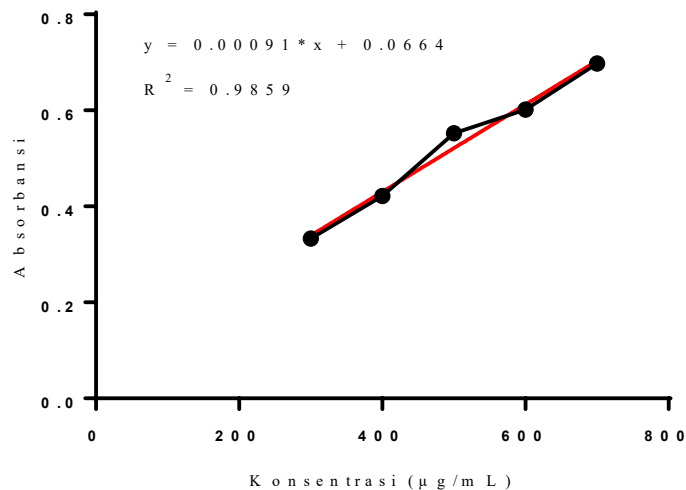
4.3 Pengukuran Kadar Fenolik Total (Singleton & Rossi)

Absorbansi dari setiap konsentrasi larutan standar *tannin* diukur dengan spektrofotometer. (Tabel 4.4)

Tabel 4.4 Absorbansi larutan standar *tannin* berdasarkan konsentrasi

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi
300	0.344
400	0.421
500	0.469
600	0.531
700	0.654

Selanjutnya dibuat kurva standar *tannin* dari konsentrasi dan absorbansi yang telah didapat. Berdasarkan kurva standar yang telah dibuat, diperoleh persamaan linier $y = 0.00073*x + 0.1188$ dengan $R^2 = 0.9706$ (Gambar 4.3).



Gambar 4.3 Kurva standar *tannin*

Persamaan linier yang didapat kemudian digunakan untuk menghitung kadar fenolik ekstrak buah kranberi dimana y adalah absorbansi sampel (ekstrak buah kranberi) dan x adalah kadar fenoliknya. Didapatkan kadar fenolik total rata-rata ekstrak buah kranberi sebesar $351.64 \mu\text{g/mL}$ (Tabel 4.5).

Tabel 4.5 Kadar fenolik total ekstrak buah kranberi

Sampel (Duplo)	Absorbansi	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata ($\mu\text{g/mL}$)
I	0.374	349.59	351.64
II	0.377	353.70	

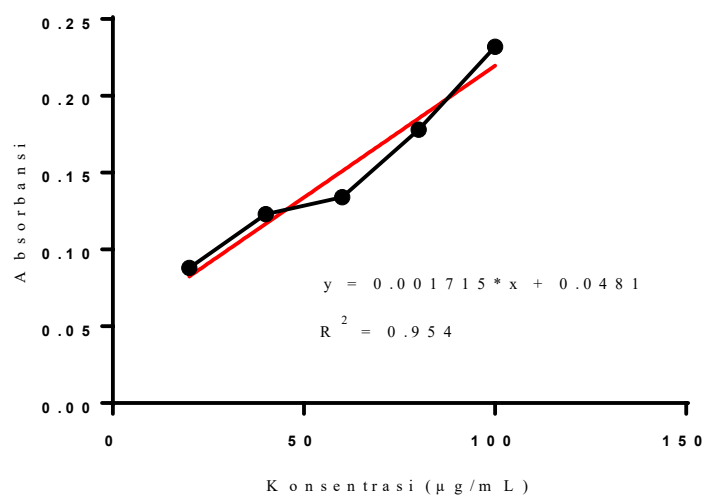
4.4 Pengukuran Kadar Alkaloid Total

Absorbansi dari setiap konsentrasi larutan *berberine chloride* diukur dengan spektrofotometer (Tabel 4.6).

Tabel 4.6 Absorbansi larutan *berberine chloride* berdasarkan konsentrasi

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi
20	0.088
40	0.123
60	0.134
80	0.178
100	0.232

Selanjutnya dibuat kurva standar *berberine chloride* dari konsentrasi dan absorbansi yang telah didapat. Berdasarkan kurva standar yang telah dibuat, diperoleh persamaan linier $y = 0.001715 \cdot x + 0.0481$ dengan $R^2 = 0.954$ (Gambar 4.4).



Gambar 4.4 Kurva standar *berberine chloride*

Persamaan linier yang didapat kemudian digunakan untuk menghitung kadar alkaloid ekstrak buah kranberi dimana y adalah absorbansi sampel (ekstrak buah kranberi) dan x adalah kadar alkaloidnya. Absorbansi sampel dibaca sesuai panjang gelombang maksimum *berberine chloride* yaitu 424 nm. Didapatkan kadar alkaloid total rata-rata ekstrak buah kranberi sebesar 66.118 µg/mL (Tabel 4.7).

Tabel 4.7 Kadar alkaloid total ekstrak buah kranberi

Sampel (Duplo)	Absorbansi	Konsentrasi (µg/mL)	Rata-rata (µg/mL)
I	0.151	60.529	66.118
II	0.170	71.706	

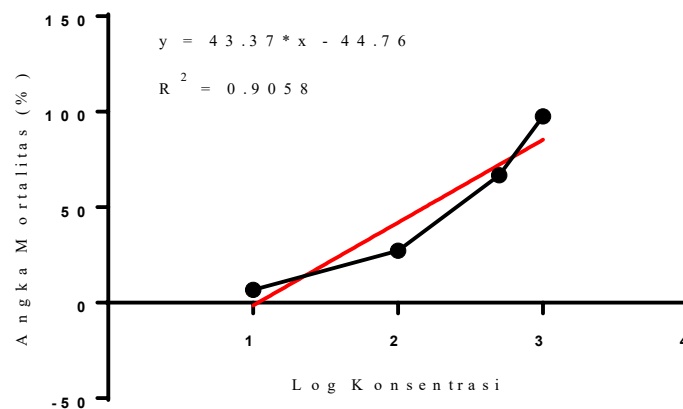
4.5 Uji Toksisitas dengan Metode BSLT (Meyer)

Uji toksisitas dilakukan pada larutan ekstrak buah kranberi dengan konsentrasi 10 µg/mL, 100 µg/mL, 500 µg/mL, dan 1000 µg/mL dan didapatkan angka mortalitas dari setiap konsentrasi (Tabel 4.8). Selanjutnya dibuat kurva angka mortalitas terhadap konsentrasi ekstrak buah kranberi dalam bentuk logaritma. Berdasarkan kurva, didapatkan persamaan linier $y = 43.37 * x - 44.76$ dengan $R^2 = 0.9058$ (Gambar 4.5). Persamaan linier yang didapat kemudian digunakan untuk menghitung *Lethality Concentration 50* (LC₅₀) yang merupakan nilai 50% probit,

yaitu konsentrasi sampel (ekstrak buah kranberi) yang mampu mematikan 50% total larva udang *Artemia Salina*. Nilai 50% probit tersebut merupakan nilai y pada persamaan linier yang didapatkan. LC₅₀ ekstrak buah kranberi sebesar 153.081 µg/mL.

Tabel 4.8 Angka mortalitas berdasarkan konsentrasi ekstrak buah kranberi

Log Konsentrasi	Jumlah Larva Hidup	Jumlah Larva Mati	Akumulasi Hidup	Akumulasi Mati	Akumulasi Mati/Total	Angka Mortalitas (%)
1	17	3	41	3	3/44	6.82
2	14	6	24	9	9/33	27.27
2.70	9	11	10	20	20/30	66.67
3	1	19	1	39	39/40	97.50



Gambar 4.5 Kurva uji toksisitas ekstrak buah kranberi

4.6 Pengukuran Aktivitas Spesifik Enzim Katalase (Maté)

4.6.1 Perhitungan Konsentrasi Hidrogen Peroksida (H₂O₂)

Larutan hidrogen peroksida (H₂O₂) 30% diencerkan dengan PBS sampai perbandingan 1 : 4000 sehingga didapatkan H₂O₂ dengan molaritas 27.2 mM.

Molaritas didapat melalui perhitungan sebagai berikut:

Berat molekul (BM) = 34 g/mol

Massa Jenis (ρ) = 1,11 g/mL

n = 1 mol

Volume H₂O₂ murni dalam 1 mol larutan H₂O₂ 30% =

$$V_{\text{H}_2\text{O}_2} = \frac{1 \text{ mL}}{4.000 \text{ mL}} = \frac{0.25 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} = 0.25 \text{ mL/L}$$

$$V = \frac{\text{BM}}{\rho}$$

$$V = \frac{34 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times 30\%}{1,11 \frac{\text{g}}{\text{mL}}} = 9.19 \text{ mL/mol}$$

Molaritas larutan H₂O₂ 1: 4000 =

$$M = \frac{n}{V} = \frac{0.25 \text{ mL} \times 1 \text{ mol}}{9,19 \text{ mL}} = 0,0272 \text{ mol} = 27.2 \text{ mM}$$

4.6.2 Penentuan Waktu dan Pengenceran Optimum

4.6.2.1 Optimasi Homogenat Organ Jantung

Optimasi homogenat organ jantung uji dilakukan dengan pengenceran 10x, 25x, 50x, dan 100x dengan jangka waktu 10 menit. Didapatkan hasil terbaik pada pengenceran 10x dengan rata-rata kecepatan reaksi pengenceran sampel (ΔV) tertinggi pada menit ke-6 yaitu sebesar 0.0040. Dengan demikian, pengukuran absorbansi untuk organ jantung uji menggunakan pengenceran 10x selama 6 menit (Tabel 4.9).

Tabel 4.9 Optimasi waktu dan pengenceran homogenat organ jantung uji

Waktu (menit)	Blanko	Rata-rata Kecepatan Reaksi Pengenceran Sampel (ΔV)			
		10x	25x	50x	100x
1	0.706	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
2	0.705	0.0020	0.0010	0.0010	-0.0050
3	0.705	0.0035	0.0015	0.0025	-0.0045
4	0.705	0.0037	0.0017	0.0030	-0.0043
5	0.705	0.0038	0.0023	0.0038	-0.0035
6	0.705	0.0040	0.0024	0.0042	-0.0030
7	0.705	0.0040	0.0023	0.0043	-0.0025
8	0.705	0.0039	0.0024	0.0043	-0.0021
9	0.705	0.0039	0.0025	0.0044	-0.0018
10	0.706	0.0040	0.0026	0.0046	-0.0014

Optimasi homogenat organ jantung kontrol dilakukan dengan pengenceran 5x, 10x, 15x, dan 20x dengan jangka waktu 10 menit. Didapatkan hasil terbaik pada pengenceran 5x dengan rata-rata kecepatan reaksi pengenceran sampel (ΔV) tertinggi pada menit ke-2 yaitu sebesar 0.0240. Dengan demikian, pengukuran absorbansi untuk organ jantung kontrol menggunakan pengenceran 5x selama 2 menit (Tabel 4.10).

Tabel 4.10 Optimasi waktu dan pengenceran homogenat organ jantung kontrol

Waktu (menit)	Blanko	Rata-rata Kecepatan Reaksi Pengenceran Sampel (ΔV)			
		5x	10x	15x	20x
1	0.706	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
2	0.705	0.0240	0.0020	0.0120	0.0090
3	0.705	0.0230	0.0035	0.0115	0.0090
4	0.705	0.0210	0.0037	0.0113	0.0087
5	0.705	0.0210	0.0038	0.0110	0.0090
6	0.705	0.0198	0.0040	0.0106	0.0088
7	0.705	0.0185	0.0040	0.0103	0.0087
8	0.705	0.0171	0.0039	0.0101	0.0086
9	0.705	0.0163	0.0039	0.0099	0.0085
10	0.706	0.0153	0.0040	0.0098	0.0084

4.6.2.2 Optimasi Lisat Darah 50%

Optimasi lisat darah uji dilakukan dengan pengenceran 10x, 25x, 50x, dan 100x dengan jangka waktu 10 menit. Didapatkan hasil terbaik pada pengenceran 10x dengan rata-rata kecepatan reaksi pengenceran sampel (ΔV) tertinggi pada menit ke-6 yaitu sebesar 0.0040. Dengan demikian, pengukuran absorbansi untuk lisat darah uji menggunakan pengenceran 10x selama 6 menit (Tabel 4.11).

Tabel 4.11 Optimasi waktu dan pengenceran lisat darah 50% uji

Waktu (menit)	Blanko	Rata-rata Kecepatan Reaksi Pengenceran Lisat Darah (ΔV)			
		10x	25x	50x	100x
1	0.706	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
2	0.705	0.0020	0.0010	0.0010	-0.0050
3	0.705	0.0035	0.0015	0.0025	-0.0045
4	0.705	0.0037	0.0017	0.0030	-0.0043
5	0.705	0.0038	0.0023	0.0038	-0.0035
6	0.705	0.0040	0.0024	0.0042	-0.0030
7	0.705	0.0040	0.0023	0.0043	-0.0025
8	0.705	0.0039	0.0024	0.0043	-0.0021
9	0.705	0.0039	0.0025	0.0044	-0.0018
10	0.706	0.0040	0.0026	0.0046	-0.0014

Optimasi lisat darah kontrol dilakukan dengan pengenceran 5x, 10x, 15x, dan 20x dengan jangka waktu 10 menit. Didapatkan hasil terbaik pada pengenceran 5x dengan rata-rata kecepatan reaksi pengenceran sampel (ΔV) tertinggi pada menit ke-5 yaitu sebesar 0.0135. Dengan demikian, pengukuran absorbansi untuk lisat darah kontrol menggunakan pengenceran 5x selama 5 menit (Tabel 4.12).

Tabel 4.12 Optimasi waktu dan pengenceran lisat darah 50% kontrol

Waktu (menit)	Blanko	Rata-rata Kecepatan Reaksi Pengenceran Lisat Darah (ΔV)			
		5x	10x	15x	20x
1	0.706	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
2	0.705	0.0060	0.0050	0.0050	0.0020
3	0.705	0.0120	0.0050	0.0050	0.0025
4	0.705	0.0133	0.0057	0.0053	0.0023
5	0.705	0.0135	0.0055	0.0055	0.0023
6	0.705	0.0128	0.0054	0.0058	0.0024
7	0.705	0.0118	0.0052	0.0060	0.0022
8	0.705	0.0114	0.0053	0.0059	0.0021
9	0.705	0.0115	0.0053	0.0058	0.0021
10	0.706	0.0113	0.0053	0.0058	0.0023

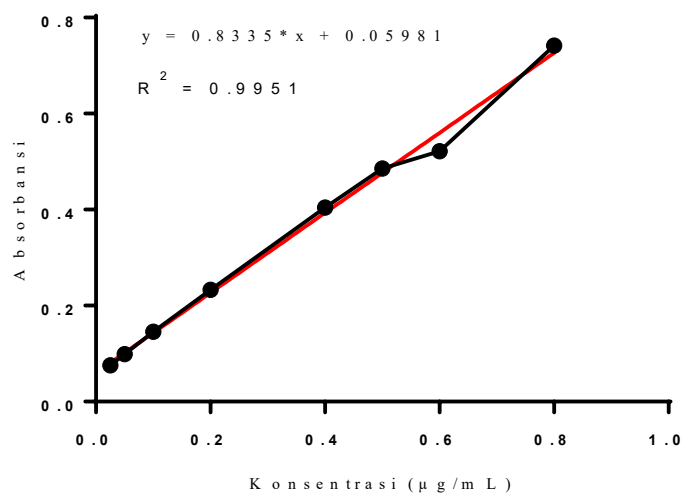
4.6.3 Pembuatan Kurva Standar Protein dengan Metode Warburg – Christian

Pembuatan standar protein dengan metode Warburg – Christian diawali dengan melarutkan *Bovine Serum Albumin* (BSA) dengan akuades sehingga didapat konsentrasi 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 0.6, dan 0.8 $\mu\text{g/mL}$. Selanjutnya dibaca absorbansi masing – masing konsentrasi dengan spektrofotometer (Tabel 4.13).

Tabel 4.13 Absorbansi standar *bovine serum albumin* (BSA)

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi
0.025	0.076
0.05	0.099
0.1	0.146
0.2	0.233
0.4	0.404
0.5	0.486
0.6	0.522
0.8	0.742

Dari hasil yang didapat, dibuat kurva standar dan didapatkan persamaan linier untuk menghitung kadar protein sampel yaitu $y = 0.8335 \cdot x + 0.05981$ dengan $R^2 = 0.9951$ (Gambar 4.6).



Gambar 4.6 Kurva standar BSA

4.6.4 Pengukuran Kadar Protein Sampel

4.6.4.1 Pengukuran Kadar Protein Sampel Organ Jantung

Absorbansi yang dibaca dari homogenat organ jantung setelah diencerkan 100x dimasukkan ke persamaan linier yang telah didapat untuk mendapatkan kadar protein sampel. Sampel dibagi menjadi kelompok uji yang dicekok dengan ekstrak buah kranberi dan kelompok kontrol yang tidak dicekok (Tabel 4.14 dan Tabel 4.15).

Tabel 4.14 Kadar protein homogenat jantung kelompok uji

Perlakuan Hipoksia	Rata-rata Kadar Protein ($\mu\text{g/mL}$)
Normoksia	18.59 ± 2.09
Hipoksia 1 hari	19.31 ± 5.00
Hipoksia 7 hari	25.16 ± 6.04
Hipoksia 14 hari	19.40 ± 0.27

Tabel 4.15 Kadar protein homogenat jantung kelompok kontrol

Perlakuan Hipoksia	Rata-rata Kadar Protein ($\mu\text{g/mL}$)
Normoksia	13.36 ± 1.40
Hipoksia 1 hari	14.85 ± 2.33
Hipoksia 7 hari	15.00 ± 2.98
Hipoksia 14 hari	18.37 ± 2.65

4.6.4.2 Pengukuran Kadar Protein Sampel Lisat Darah 50%

Absorbansi yang dibaca dari lisat darah 50% setelah diencerkan 200x dimasukkan ke persamaan linier yang telah didapat untuk mendapatkan kadar protein sampel. Sampel dibagi menjadi kelompok uji yang dicekok dengan ekstrak buah kranberi dan kelompok kontrol yang tidak dicekok (Tabel 4.16 dan Tabel 4.17).

Tabel 4.16 Kadar protein lisat darah 50% kelompok uji

Perlakuan Hipoksia	Rata-rata Kadar Protein ($\mu\text{g/mL}$)
Normoksia	0.452 ± 0.093
Hipoksia 1 hari	0.342 ± 0.097
Hipoksia 7 hari	0.483 ± 0.026
Hipoksia 14 hari	0.420 ± 0.104

Tabel 4.17 Kadar protein lisat darah 50% kelompok kontrol

Perlakuan Hipoksia	Rata-rata Kadar Protein ($\mu\text{g/mL}$)
Normoksia	0.517 ± 0.178
Hipoksia 1 hari	0.297 ± 0.057
Hipoksia 7 hari	0.400 ± 0.056
Hipoksia 14 hari	0.396 ± 0.044

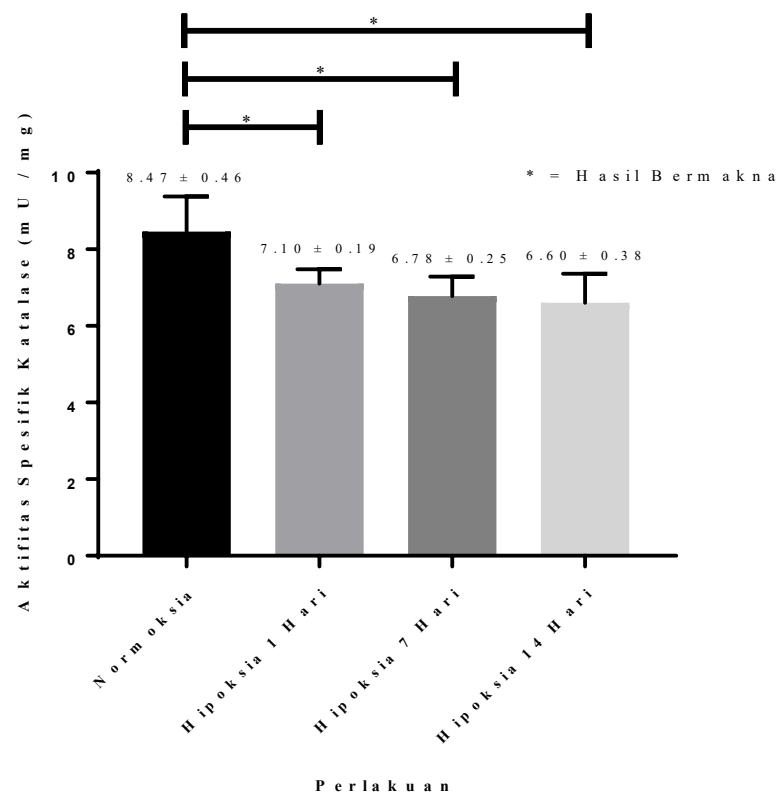
4.6.5 Aktivitas Spesifik Enzim Katalase

4.6.5.1 Aktivitas Spesifik Enzim Katalase Organ Jantung

Hasil menunjukkan adanya penurunan aktivitas spesifik enzim katalase organ jantung pada kelompok uji seiring bertambah lama durasi hipoksia. Aktivitas spesifik tertinggi terlihat pada kelompok normoksia yaitu sebesar 8.47 mU/mg protein dan terendah pada kelompok hipoksia 14 hari yaitu sebesar 6.60 mU/mg protein (Tabel 4.18). Terdapat perbedaan yang bermakna dengan uji statistik *t-test* antara aktivitas spesifik enzim katalase pada organ jantung tikus kelompok uji dalam kondisi normoksia dengan perlakuan hipoksia 1 hari ($p = 0.0329$), 7 hari ($p = 0.0179$), dan 14 hari ($p = 0.0201$) (Gambar 4.7).

Tabel 4.18 Rata-rata aktivitas spesifik enzim katalase jantung kelompok uji

Perlakuan Hipoksia	Rata-rata Aktivitas Spesifik Enzim Katalase (mU/mg protein)
Normoksia	8.47 ± 0.46
Hipoksia 1 hari	7.10 ± 0.19
Hipoksia 7 hari	6.78 ± 0.25
Hipoksia 14 hari	6.60 ± 0.38



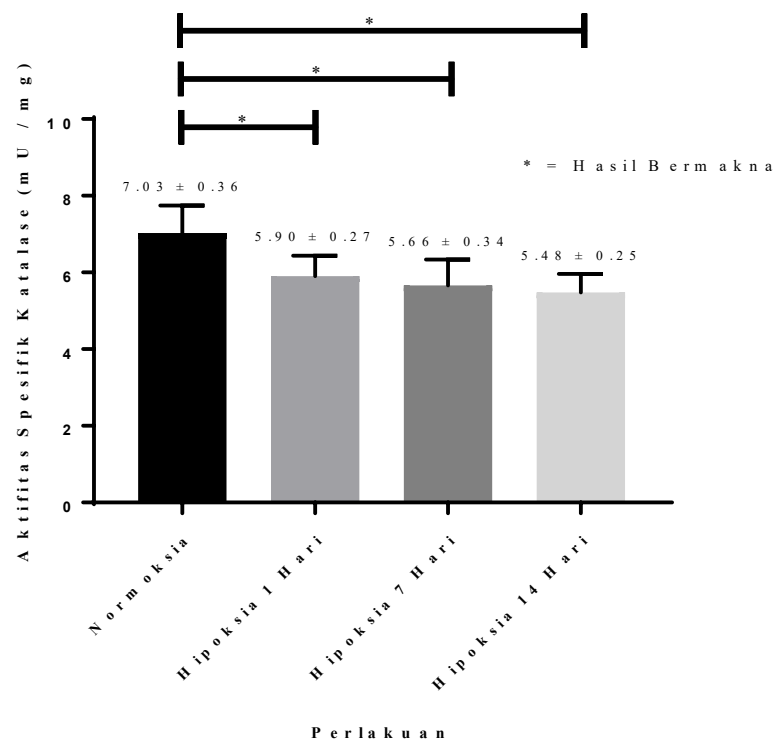
Gambar 4.7 Aktivitas spesifik katalase jantung kelompok uji

Hasil menunjukkan adanya penurunan aktivitas spesifik enzim katalase organ jantung pada kelompok kontrol seiring bertambah lama durasi hipoksia. Aktivitas spesifik tertinggi terlihat pada kelompok normoksia yaitu sebesar 7.03 mU/mg protein dan terendah pada kelompok hipoksia 14 hari yaitu sebesar 5.48 mU/mg protein (Tabel 4.19). Terdapat perbedaan yang bermakna dengan uji

statistik *t-test* antara aktivitas spesifik enzim katalase pada organ jantung tikus kelompok kontrol dalam kondisi normoksia dengan perlakuan hipoksia 1 hari ($p = 0.0329$), 7 hari ($p = 0.0179$), dan 14 hari ($p = 0.0201$) (Gambar 4.8).

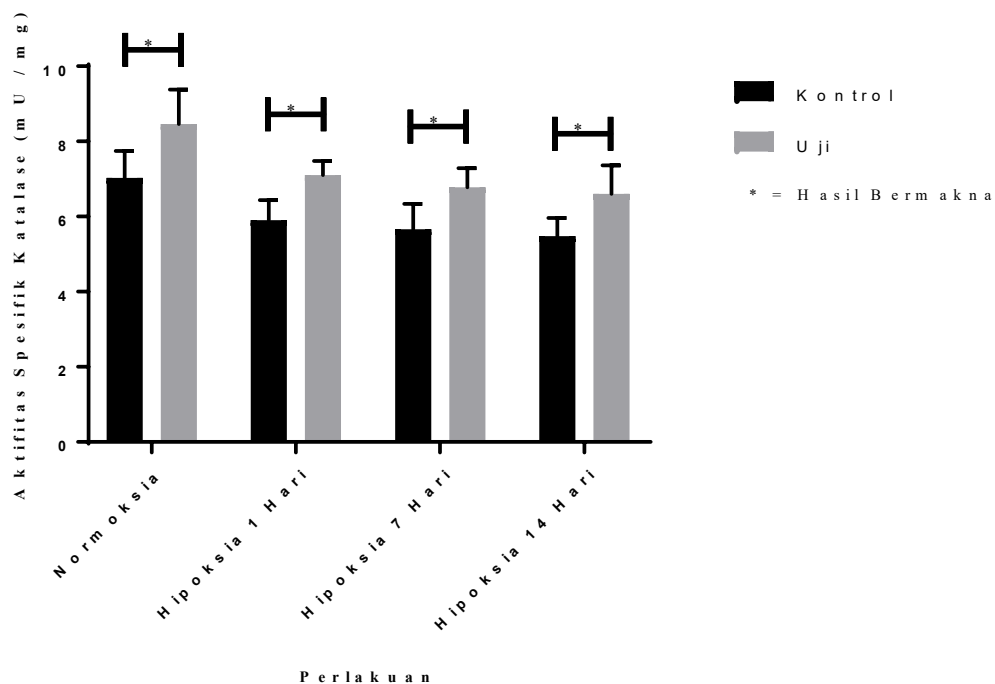
Tabel 4.19 Rata-rata aktivitas spesifik enzim katalase jantung kelompok kontrol

Perlakuan Hipoksia	Rata-rata Aktivitas Spesifik Enzim Katalase (mU/mg protein)
Normoksia	7.03 ± 0.36
Hipoksia 1 hari	5.90 ± 0.27
Hipoksia 7 hari	5.66 ± 0.34
Hipoksia 14 hari	5.48 ± 0.25



Gambar 4.8 Aktivitas spesifik katalase jantung kelompok kontrol

Aktivitas spesifik enzim katalase pada organ jantung mengalami penurunan seiring bertambah lamanya perlakuan hipoksia pada kelompok uji dan kontrol. Aktivitas spesifik enzim katalase pada kelompok uji memiliki nilai yang lebih tinggi dibanding kelompok kontrol. Terdapat perbedaan yang bermakna dengan uji statistik *t-test* antara aktivitas spesifik enzim katalase pada organ jantung tikus kelompok uji dan kontrol dalam kondisi normoksia ($p = 0.0481$), hipoksia 1 hari ($p = 0.0105$), 7 hari ($p = 0.0375$), dan 14 hari ($p = 0.0462$) (Gambar 4.9).



Gambar 4.9 Aktivitas spesifik katalase jantung kelompok kontrol dan uji

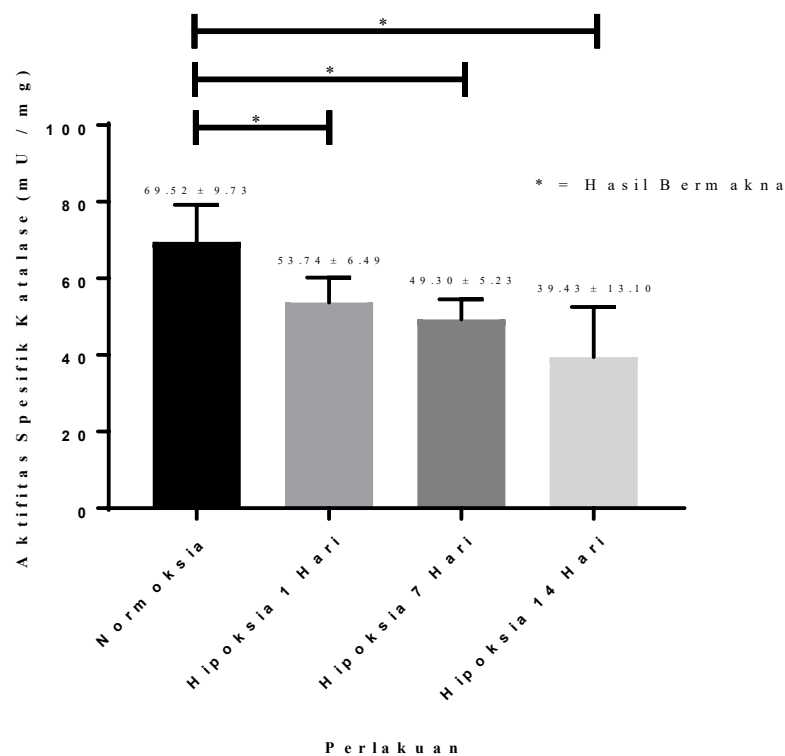
4.6.5.2 Aktivitas Spesifik Enzim Katalase Lisat Darah 50%

Hasil menunjukkan adanya penurunan aktivitas spesifik enzim katalase lisat darah 50% pada kelompok uji seiring bertambah lama durasi hipoksia. Aktivitas spesifik tertinggi terlihat pada kelompok normoksia yaitu sebesar 69.52 mU/mg protein dan terendah pada kelompok hipoksia 14 hari yaitu sebesar 39.43 mU/mg protein (Tabel 4.20). Terdapat perbedaan yang bermakna dengan uji statistik *t-test* antara aktivitas spesifik enzim katalase pada darah tikus kelompok uji dalam

kondisi normoksia dengan perlakuan hipoksia 1 hari ($p = 0.0357$), 7 hari ($p = 0.0106$), dan 14 hari ($p = 0.0102$) (Gambar 4.10).

Tabel 4.20 Rata-rata aktivitas spesifik enzim katalase darah kelompok uji

Perlakuan Hipoksia	Rata-rata Aktivitas Spesifik Enzim Katalase (mU/mg protein)
Normoksia	69.52 ± 9.73
Hipoksia 1 hari	53.74 ± 6.49
Hipoksia 7 hari	49.30 ± 5.23
Hipoksia 14 hari	39.43 ± 13.10

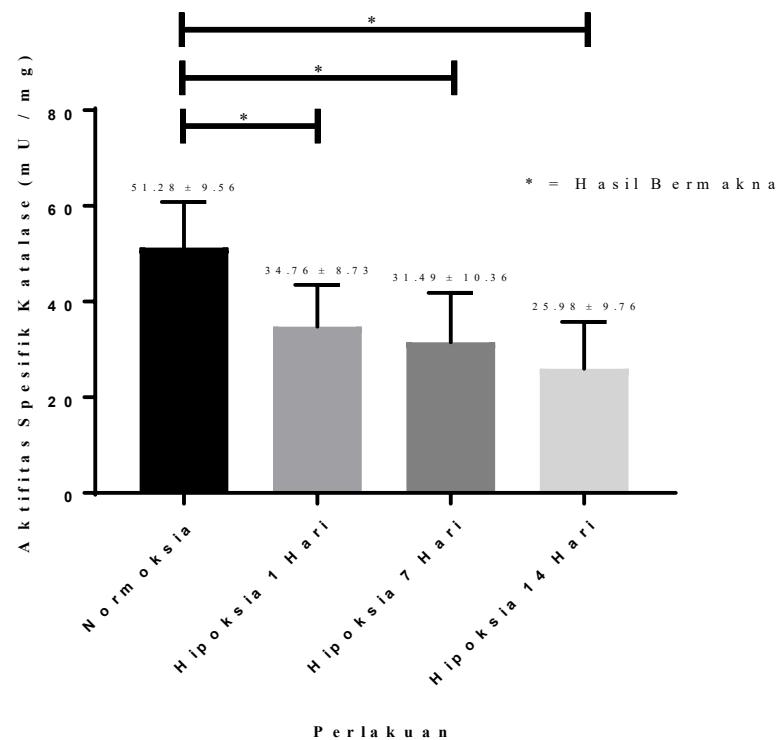


Gambar 4.10 Aktivitas spesifik katalase darah kelompok uji

Hasil menunjukkan adanya penurunan aktivitas spesifik enzim katalase lisat darah 50% pada kelompok kontrol seiring bertambah lama durasi hipoksia. Aktivitas spesifik tertinggi terlihat pada kelompok normoksia yaitu sebesar 51.28 mU/mg protein dan terendah pada kelompok hipoksia 14 hari yaitu sebesar 25.98 mU/mg protein (Tabel 4.21). Terdapat perbedaan yang bermakna dengan uji statistik *t-test* antara aktivitas spesifik enzim katalase pada darah tikus kelompok kontrol dalam kondisi normoksia dengan perlakuan hipoksia 1 hari ($p= 0.0434$), 7 hari ($p= 0.0308$), dan 14 hari ($p= 0.0100$) (Gambar 4.11).

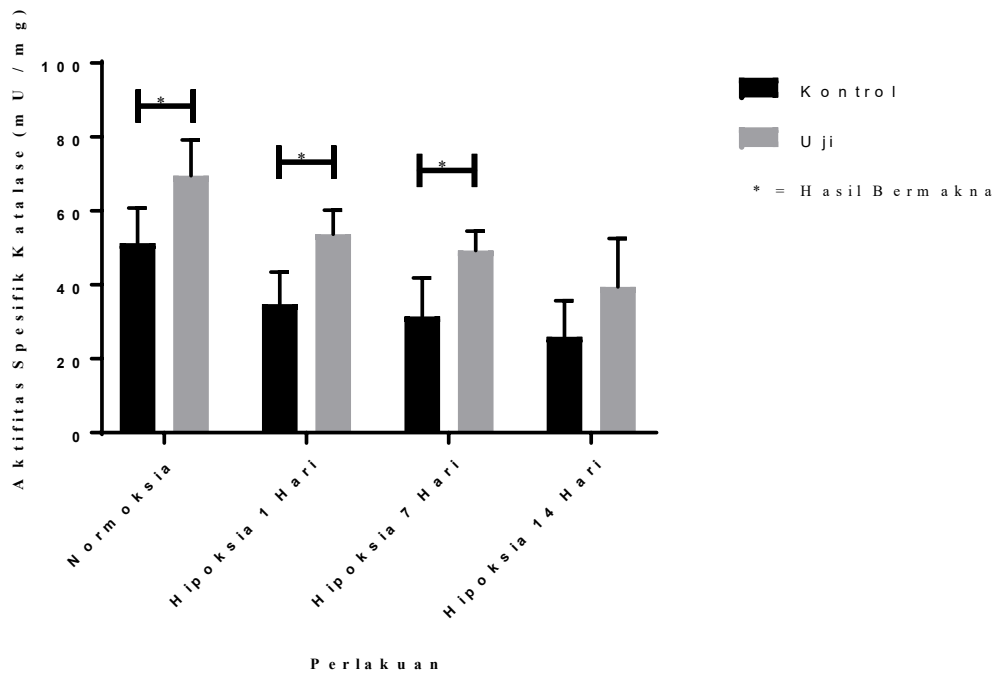
Tabel 4.21 Rata-rata Aktivitas spesifik enzim katalase darah kelompok kontrol

Perlakuan Hipoksia	Rata-rata Aktivitas Spesifik Enzim Katalase (mU/mg protein)
Normoksia	51.28 ± 9.56
Hipoksia 1 hari	34.76 ± 8.73
Hipoksia 7 hari	31.49 ± 10.36
Hipoksia 14 hari	25.98 ± 9.76



Gambar 4.11 Aktivitas spesifik katalase darah kelompok kontrol

Aktivitas spesifik enzim katalase pada lisat darah 50% mengalami penurunan seiring bertambah lamanya perlakuan hipoksia pada kelompok uji dan kontrol. Aktivitas spesifik enzim katalase pada kelompok uji memiliki nilai yang lebih tinggi dibanding kelompok kontrol. Terdapat perbedaan yang bermakna dengan uji statistik *t-test* antara aktivitas spesifik enzim katalase pada darah tikus kelompok uji dan kontrol dalam kondisi normoksia ($p = 0.0368$), hipoksia 1 hari ($p = 0.0130$), dan 7 hari ($p = 0.0220$). Tidak terdapat perbedaan yang bermakna dengan uji statistik *t-test* antara aktivitas spesifik enzim katalase pada darah tikus kelompok uji dan kontrol dalam kondisi hipoksia 14 hari ($p = 0.1508$) (Gambar 4.12).



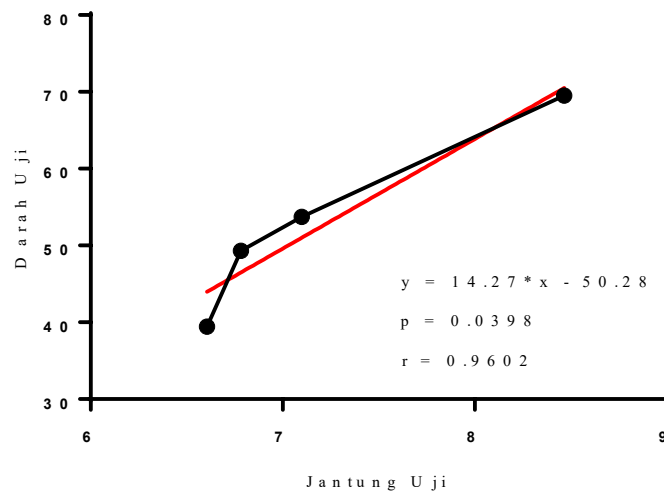
Gambar 4.12 Aktivitas spesifik katalase darah kelompok kontrol dan uji

4.6.6 Hubungan Aktivitas Spesifik Enzim Katalase pada Jantung dan Darah

4.6.6.1 Hubungan Aktivitas Spesifik Enzim Katalase pada Jantung dan Darah Kelompok Uji

Didapati aktivitas spesifik enzim katalase lisat darah 50% lebih tinggi dari organ jantung baik pada perlakuan normoksia maupun hipoksia. Aktivitas spesifik katalase tertinggi baik di darah maupun jantung terdapat pada normoksia dan semakin menurun hingga terendah pada perlakuan hipoksia 14 hari.

Terdapat hubungan yang sangat kuat dan bermakna antara aktivitas spesifik enzim katalase pada darah dan jantung tikus kelompok uji setelah diuji secara statistik dengan metode *Pearson Correlation* ($p = 0.0398$, $r = 0.9602$) (Gambar 4.13).

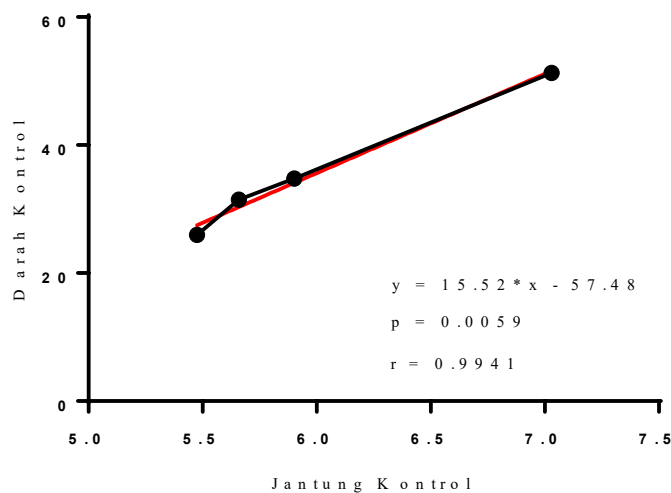


Gambar 4.13 Grafik hubungan aktivitas spesifik enzim katalase pada darah dengan jantung tikus kelompok uji

4.6.6.1 Hubungan Aktivitas Spesifik Enzim Katalase pada Jantung dan Darah Kelompok Kontrol

Didapati aktivitas spesifik enzim katalase lisat darah 50% lebih tinggi dari organ jantung baik pada perlakuan normoksia maupun hipoksia. Aktivitas spesifik katalase tertinggi baik di darah maupun jantung terdapat pada kondisi normoksia dan semakin menurun hingga terendah pada perlakuan hipoksia 14 hari.

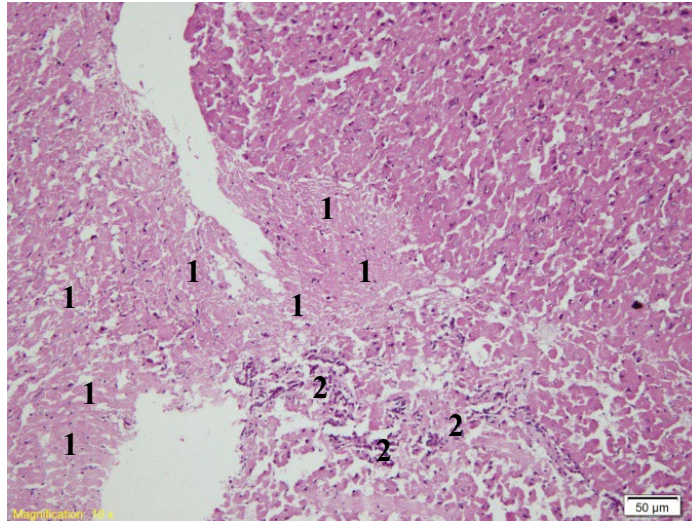
Terdapat hubungan yang sangat kuat dan bermakna antara aktivitas spesifik enzim katalase pada darah dan jantung tikus kelompok kontrol setelah diuji secara statistik dengan metode *Pearson Correlation* ($p = 0.0059$, $r = 0.9941$) (Gambar 4.14).



Gambar 4.14 Grafik hubungan aktivitas spesifik enzim katalase pada darah dengan jantung tikus kelompok kontrol

4.7 Pemeriksaan Patologi Anatomi Jantung

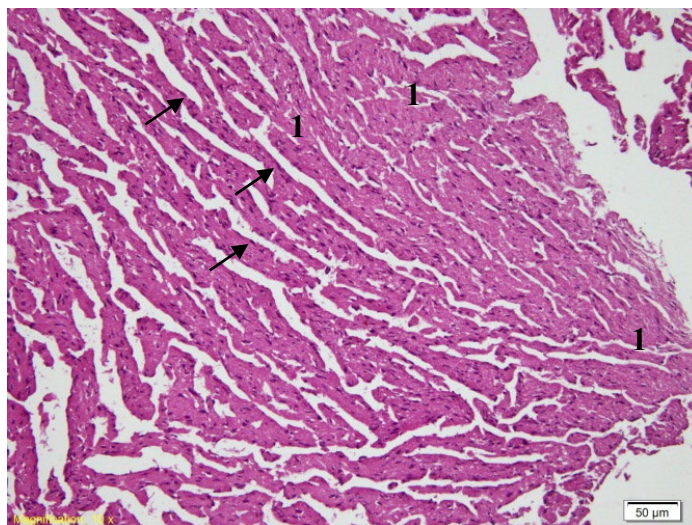
Pemeriksaan patologi anatomi jantung tikus dilakukan menggunakan mikroskop cahaya dan pewarnaan dilakukan dengan metode *Hematoxylin Eosin* (HE). Gambaran patologi anatomi jantung tikus kelompok kontrol (tidak diberi ekstrak buah kranberi) yang dihipoksia selama 14 hari, inti sel miosit tidak terlihat jelas menandakan daerah nekrosis yang cukup luas dan terdapat sebulan sel radang (Gambar 4.16). Gambaran patologi anatomi jantung tikus kelompok uji (diberi ekstrak buah kranberi) yang dihipoksia selama 14 hari, kerusakan yang terjadi lebih ringan, inti sel miosit masih terlihat jelas dan daerah nekrosis yang tidak luas dibandingkan kelompok kontrol (Gambar 4.17).



Gambar 4.15 Gambaran histopatologi jantung kelompok kontrol dengan perlakuan hipoksia 14 hari

Pewarnaan *Hematoxylin Eosin*, pembesaran 100x

Keterangan: (1) nekrosis miosit, (2) sebaran sel radang



Gambar 4.16 Gambaran histopatologi jantung kelompok uji dengan perlakuan hipoksia 14 hari

Pewarnaan *Hematoxylin Eosin*, pembesaran 100x

Keterangan: (1) nekrosis miosit, (←) inti sel miosit

BAB 5

PEMBAHASAN

5.1 Uji Fitokimia

Uji fitokimia ekstrak buah kranberi dilakukan untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder yang terdapat dalam sampel. Dari uji yang dilakukan, diketahui bahwa ekstrak buah kranberi memiliki kandungan metabolit sekunder *alkaloid, phenols, anthocyanin, betacyanin, cardio glycosides, coumarins, flavonoids, glycosides, quinones, steroids, terpenoids*, dan *tannins*. Hal ini sejalan dengan skrining fitokimia terhadap ekstrak kranberi (*Vaccinium macrocarpon*) yang dilakukan oleh Krishnaeswari, dkk. dimana didapati hasil positif pada pemeriksaan *tannins, flavonoids, quinones, glycosides, cardio glycosides, terpenoids, phenols, coumarins, steroids*, dan *betacyanin*.⁵⁹ Kandungan *anthocyanin* dalam ekstrak kranberi sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Brown, dkk.³⁶ Kandungan *alkaloid* pada *Vaccinium macrocarpon* sejalan dengan penelitian Booth, dkk.⁶⁰ Metabolit sekunder diketahui memiliki kemampuan antioksidan yang baik.^{26,60} Maka dari itu, hasil uji fitokimia ini dapat membuktikan bahwa kranberi memiliki kemampuan sebagai antioksidan serta jika dikonsumsi dapat mengurangi resiko berbagai penyakit yang disebabkan oleh stres oksidatif .

5.2 Uji Kapasitas Total Antioksidan buah kranberi dengan Larutan DPPH (Blois)

Uji kapasitas total antioksidan dengan metode Blois dilakukan terhadap asam askorbat dan ekstrak buah kranberi. Dari hasil pengujian, didapati IC_{50} asam askorbat adalah $4.780 \mu\text{g/mL}$ dan IC_{50} ekstrak buah kranberi adalah $49.760 \mu\text{g/mL}$. IC_{50} adalah konsentrasi sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50% radikal bebas DPPH⁵³. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Kalin, dkk. dimana didapati IC_{50} kranberi sebesar $86.63 \mu\text{g/mL}$.⁶² Asam askorbat memang ditetapkan sebagai standar antioksidan karena sudah diketahui kapasitas antioksidannya yang tinggi. Walaupun lebih rendah dari asam askorbat, kapasitas antioksidan yang dimiliki kranberi tetap dianggap sangat kuat sesuai klasifikasi

yang digunakan dalam penelitian Dewi, dkk. dimana $IC_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$ dikatakan memiliki kapasitas antioksidan sangat kuat, $50 - 100 \mu\text{g/mL}$ kuat, $250 - 500 \mu\text{g/mL}$ menengah, dan $>500 \mu\text{g/mL}$ lemah.⁶³ Dari hasil uji kapasitas antioksidan, diketahui bahwa kranberi memiliki kemampuan untuk menghambat radikal bebas dan jika dikonsumsi dapat menghambat berbagai penyakit yang dipicu oleh stres oksidatif.

5.3 Kadar Fenolik Total (Singleton & Rossi)

Berdasarkan hasil pengukuran kadar fenolik total ekstrak buah kranberi dengan metode Singleton & Rossi, didapati nilainya adalah $343.444 \mu\text{g/mL}$. Dalam studi sebelumnya, diketahui bahwa fenol memiliki efek antioksidan serta dapat menghambat *low-density lipoprotein* (LDL) dan *liposome oxidation* sehingga berperan dalam menurunkan insiden penyakit kardiovaskular dan penyakit degeneratif lainnya yang disebabkan stres oksidatif.⁶⁴

5.4 Kadar Alkaloid Total (Trivedi, dkk.)

Berdasarkan hasil pengukuran kadar alkaloid total ekstrak buah kranberi, didapati nilainya adalah $66.118 \mu\text{g/mL}$. Alkaloid diketahui memiliki aktivitas sebagai anti-tumor. Beberapa mekanisme yang menjelaskan aktivitas anti-tumor alkaloid antara lain dengan mengaktifkan *casepase-3 pathways* yang menginduksi apoptosis sel kanker kolon, merusak DNA limfosit pada leukemia, menghambat aktivitas sel kanker dengan menekan *c-Src/FAK* dan *IL-6/STAT3 pathways*.⁶⁵ Dari hasil pengukuran kadar alkaloid total, diketahui bahwa kranberi berpotensi untuk menghambat pertumbuhan sel kanker jika dikonsumsi.

5.5 Uji Toksisitas dengan Metode BSLT (Meyer)

Dari hasil uji toksisitas dengan metode BSLT, didapatkan angka *Lethality Concentration 50* (LC_{50}) yaitu konsentrasi sampel (ekstrak buah kranberi) yang mampu mematikan 50% total larva udang *Artemia Salina* dimana $LC_{50} < 20 \mu\text{g/mL}$ berarti sangat toksik, $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ berarti toksik, dan $LC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ berarti tidak toksik. Ekstrak buah kranberi memiliki sifat toksik karena dari hasil uji didapati LC_{50} sebesar $153.081 \mu\text{g/mL}$. Sifat toksik yang dimaksud adalah kemampuan ekstrak buah kranberi untuk menghambat sel yang sedang aktif

berproliferasi (dalam hal ini larva udang *Artemia Salina*). Menurut Mbwambo, dkk., Pisutthanan, dkk., dan Krishnarajum dkk., semakin rendah LC_{50} suatu zat mengindikasikan semakin tinggi pula konsentrasi komponen sitotoksik poten.⁶⁶⁻⁶⁸ Sehingga diketahui bahwa ekstrak buah kranberi memiliki potensi sebagai anti-kanker.

5.6 Aktivitas Spesifik Enzim Katalase (Maté)

Berdasarkan hasil pengukuran, didapati penurunan bermakna aktivitas spesifik enzim katalase dengan uji statistik *t-test* ($p < 0.05$) pada organ jantung tikus seiring bertambah lamanya perlakuan hipoksia baik pada kelompok uji maupun kelompok kontrol. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Chen, dkk. dimana didapati bahwa keadaan hipoksia meningkatkan radikal bebas.⁶⁹ Peningkatan radikal bebas akan menimbulkan kondisi stres oksidatif yang dapat menginduksi apoptosis dan kematian sel, dalam hal ini sel-sel jantung. Kematian sel akan berakibat menurunnya katalase yang diketahui ditemukan pada peroksisom, sitoplasma, mitokondria, dan membran sitoplasmik sehingga berujung dengan menurunnya juga aktivitas spesifik enzim katalase pada organ jantung.³¹

Didapati pula penurunan bermakna aktivitas spesifik enzim katalase dengan uji statistik *t-test* ($p < 0.05$) pada darah tikus seiring bertambah lamanya perlakuan hipoksia pada kelompok uji maupun kelompok kontrol. Dalam kondisi hipoksia, HIF-1 α akan bekerja mempersiapkan tubuh untuk beradaptasi terhadap kondisi tersebut, salah satunya melalui eritropoesis.²⁴ Dalam percobaan yang dilakukan oleh Song, dkk., eritropoesis yang dimediasi HIF-1 α akan menghasilkan eritrosit dengan aktivitas katalase yang rendah dan cenderung dihancurkan ketika kembali ke kondisi normoksia karena ketidakmampuannya untuk melawan ROS.⁷⁰ Dengan demikian, akan semakin sedikit eritrosit yang ada seiring bertambah lama durasi hipoksia dan berdampak pada penurunan aktivitas spesifik katalase pada darah.

Terdapat peningkatan bermakna aktivitas spesifik enzim katalase dengan uji statistik *t-test* ($p < 0.05$) pada jantung kelompok uji jika dibandingkan dengan kelompok kontrol dalam perlakuan normoksia, hipoksia 1 hari, hipoksia 7 hari, dan hipoksia 14 hari. Pada darah, hampir semua kelompok uji mengalami peningkatan bermakna aktivitas spesifik enzim katalase dengan uji statistik *t-test* ($p < 0.05$) jika

dibandingkan dengan kelompok kontrol (perlakuan normoksia, hipoksia 1 hari, dan hipoksia 7 hari). Hal ini sejalan dengan studi yang dilakukan oleh Bouayed dan Bohn dimana dikatakan bahwa antioksidan endogen dan eksogen secara sinergis menjaga atau mengembalikan homeostasis redoks.⁷¹ Pemberian ekstrak kranberi yang dianggap sebagai antioksidan eksogen kepada tikus akan mengurangi ROS yang terbentuk akibat hipoksia sehingga efek negatif dari ROS terhadap jantung (apoptosis dan kematian sel) serta darah (eritropoesis yang diinduksi HIF-1 α dan destruksi eritrosit) berkurang dan berujung pada peningkatan aktivitas spesifik enzim katalase.^{31,70} Pada darah tikus dengan perlakuan hipoksia 14 hari, tidak terdapat perbedaan bermakna dengan uji statistik *t-test* ($p > 0.05$) antara kelompok uji dan kelompok kontrol, namun tetap terjadi peningkatan aktivitas spesifik enzim katalase sesuai tren yang ada. Hal ini kemungkinan terkait mekanisme kompensasi yang menyebabkan penurunan produksi ROS, sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Hodyc, dkk.⁷²

Terdapat hubungan yang sangat kuat dan bermakna dengan uji statistik *Pearson Correlation* antara aktivitas spesifik enzim katalase organ jantung dan darah tikus yang dihipoksia baik pada kelompok uji yang dicekok dengan ekstrak kranberi ($p = 0.0398$, $r = 0.9602$) maupun kelompok kontrol ($p = 0.0059$, $r = 0.9941$). Menurut Hodyc, dkk., hipoksia meningkatkan produksi ROS (superoksida dan hidrogen peroksida) di rantai transpor elektron dalam mitokondria. Selanjutnya, ROS akan menyebabkan kerusakan vaskular melalui mekanisme enzimatik yaitu *xanthine oxidase* dan *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS) yang akan diubah menjadi *superoxide-generating enzyme* (proses *eNOS uncoupling*). Produksi kedua enzim tersebut akan meningkatkan jumlah superoksida dan produk mutasinya yaitu hidrogen peroksida di pembuluh darah dan berujung pada kerusakan yang bersifat sistemik. Dalam penelitian tersebut, terdapat peroksidasi lipid yang diinduksi ROS pada eritrosit, yang membuktikan bahwa hipoksia sistemik kronik akan berpengaruh terhadap darah.⁷² Hal ini sejalan dengan temuan dari uji korelasi dimana terdapat penurunan aktivitas spesifik katalase pada jaringan yang diikuti darah seiring bertambah lama durasi hipoksia baik pada kelompok uji maupun kelompok kontrol.

5.7 Pemeriksaan Patologi Anatomi

Menurut Ilic, dkk., kondisi iskemia pada jantung akan menyebabkan nekrosis dari miosit dan berujung kepada infark miokard. Dalam penelitian ini, tikus diberi perlakuan hipoksia sistemik, sehingga terjadi iskemia secara sistemik pula. Kondisi iskemia sistemik juga berdampak iskemia pada jantung.²⁵

Hasil pemeriksaan patologi anatomi pada jantung tikus kelompok kontrol setelah dihipoksia selama 14 hari sesuai dengan pendapat tersebut, dimana terlihat gambaran nekrosis di area yang cukup luas. Nekrosis miosit ditandai dengan hilangnya inti sel.⁷³ Terlihat pula sebaran sel radang yang menandakan terjadinya proses inflamasi. Gambaran patologi anatomi yang didapat sesuai dengan temuan pada jantung yang mengalami infark miokard.⁷⁴

Hasil pemeriksaan patologi anatomi pada jantung tikus kelompok uji setelah dihipoksia selama 14 hari menunjukkan kerusakan yang lebih ringan dimana ditemui titik-titik nekrosis yang lebih sedikit dan tidak ditemukannya sebaran sel radang. Hal ini sesuai dengan pendapat Cabigas, dkk. dimana dikatakan bahwa dalam keadaan infark miokard, ekspresi berlebihan dari katalase memiliki efek protektif dan membantu proses penyembuhan secara akut maupun kronik.³³ Hal ini sejalan dengan hasil pengukuran aktivitas spesifik enzim katalase dimana ditemukan nilai yang lebih tinggi pada kelompok uji dibandingkan dengan kelompok kontrol.

5.8 Keterbatasan Penelitian

1. Pemeriksaan secara *in vitro* untuk mengetahui kemampuan antioksidan buah kranberi masih kurang.
2. Durasi hipoksia yang dilakukan terhadap tikus terlalu singkat sehingga pengaruh stres oksidatif yang diharapkan kurang terlihat secara signifikan.
3. Tidak dilakukan pemeriksaan efek stres oksidatif pada organ lain dan dengan *marker* lain.

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

1. Ekstrak buah kranberi mengandung *alkaloid, phenols, anthocyanin, betacyanin, cardio glycosides, coumarins, flavonoids, glycosides, quinones, steroids, terpenoids*, dan *tannins*.
2. Kapasitas total antioksidan ekstrak buah kranberi IC₅₀ sebesar 49.760 $\mu\text{g/mL}$.
3. Kadar fenolik total ekstrak buah kranberi sebesar 351.64 $\mu\text{g/mL}$.
4. Kadar alkaloid total ekstrak buah kranberi sebesar 66.118 $\mu\text{g/mL}$.
5. Ekstrak buah kranberi memiliki nilai toksisitas LC₅₀ sebesar 153.081 $\mu\text{g/mL}$.
6. Terjadi penurunan aktivitas spesifik enzim katalase pada jantung dan darah tikus *Sprague Dawley* seiring bertambah lamanya perlakuan hipoksia sistemik kronik pada kelompok uji dan kontrol.
7. Terjadi peningkatan aktivitas spesifik enzim katalase pada jantung dan darah tikus *Sprague Dawley* yang diinduksi hipoksia sistemik kronik dan diberi ekstrak buah kranberi dibandingkan kelompok kontrol.
8. Terdapat hubungan yang sangat kuat dan bermakna antara aktivitas spesifik enzim katalase pada jantung dan darah tikus *Sprague Dawley* baik kelompok uji maupun kelompok kontrol.
9. Gambaran patologi anatomi organ jantung tikus *Sprague Dawley* yang diberi ekstrak buah kranberi setelah diinduksi hipoksia sistemik kronik terlihat kerusakan yang lebih ringan dibandingkan kelompok kontrol.

6.2 Saran

1. Dilakukan pemeriksaan *in vitro* lebih lanjut terhadap buah kranberi dengan metode-metode lain (*Total Anthocyanin Content*, dll.).
2. Durasi perlakuan hipoksia terhadap tikus ditambah agar efek stres oksidatif yang diharapkan terlihat lebih signifikan (4-6 minggu).
3. Dilakukan pemeriksaan *marker* stres oksidatif dan organ lain.
4. Dilakukan uji yang lebih spesifik untuk mengetahui efek terapi dari buah kranberi terhadap penyakit tertentu misalnya dengan tikus *Sprague Dawley outbred* gagal jantung kongestif.

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization. Assessing national capacity for the prevention and control of noncommunicable diseases: global survey, 2015. 2016 (cited 2018 Oct 24). Available from:
<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/246223/1/9789241565363-eng.pdf>
2. Biswas SK. Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox? *Oxid Med Cell Longev*. 2016 (cited 2018 Oct 24);2016: Available from:
<https://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/5698931/>
3. Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y, et al. Ros and ros-mediated cellular signaling. *Oxid Med Cell Longev*. 2016 (cited 2018 Oct 24);2016: Available from: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/4350965/>
4. Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Weil PA. Harper's illustrated biochemistry. 31st ed. New York Chicago San Francisco Athens London Madrid Mexico City Milan New Delhi Singapore Sydney Toronto: McGraw-Hill Education; 2018. p. 119-25.
5. Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia*. 2015;3:83-92.
6. Chen X, Song M, Zhang B, Zhang Y. Reactive oxygen species regulate t cell immune response in the tumor microenvironment. *Oxid Med Cell Longev*. 2016 (cited 2018 Oct 24);2016: Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4980531/>
7. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ros) and ros-induced ros release. *Physiol Rev*. 2014;94(3):909–50.
8. Yao X, Carlson D, Sun Y, Ma L, Wolf SE, Minei JP, et al. Mitochondrial ros induces cardiac inflammation via a pathway through mtdna damage in a pneumonia-related sepsis model. *PLOS ONE*. 2015 (cited 2018 Oct 25);10(10): Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4598156/>
9. Kurian GA, Rajagopal R, Vedantham S, Rajesh M. The role of oxidative stress in myocardial ischemia and reperfusion injury and remodeling: revisited. *Oxid Med Cell Longev*. 2016 (cited 2018 Oct 25);2016: Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4897712/>
10. Gupta RK, Patel AK, Shah N, Choudhary AK, Jha UK, Yadav UC, et al. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(11):4405–9.
11. Apostolova N, Victor VM. Molecular strategies for targeting antioxidants to mitochondria: therapeutic implications. *Antioxid Redox Signal*. 2015;22(8):686–729.
12. Lei XG, Zhu J-H, Cheng W-H, Bao Y, Ho Y-S, Reddi AR, et al. Paradoxical roles of antioxidant enzymes: basic mechanisms and health implications. *Physiol Rev*. 2016;96(1):307–64.

13. Martins D, English AM. Catalase activity is stimulated by h₂o₂ in rich culture medium and is required for h₂o₂ resistance and adaptation in yeast. *Redox Biol.* 2014;2:308–13.
14. Skrovankova S, Sumczynski D, Mlcek J, Jurikova T, Sochor J. Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. *Int J Mol Sci.* 2015;16(10):24673–706.
15. Chen Y-R, Zweier JL. Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation. *Circ Res.* 2014;114(3):524–37.
16. Holzerová E, Prokisch H. Mitochondria: much ado about nothing? how dangerous is reactive oxygen species production? *Int J Biochem Cell Biol.* 2015;63:16–20.
17. Mach WJ, Thimmesch AR, Pierce JT, Pierce JD. Consequences of hyperoxia and the toxicity of oxygen in the lung. *Nurs Res Pract.* 2011 (cited 2018 Nov 1);2011:Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3169834/>
18. Di Meo S, Reed TT, Venditti P, Victor VM. Role of ros and rns sources in physiological and pathological conditions. *Oxid Med Cell Longev.* 2016 (cited 2018 Nov 1);2016: Available from:
<https://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/1245049/>
19. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine.* Oxford: OUP Oxford; 2015. p. 565-7
20. Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2011;25(3):287–99.
21. Sherwood L. *Human physiology: from cells to systems.* 9th edition. Boston: Cengage Learning; 2016. p. 325-55.
22. Voet D, Voet JG. *Biochemistry.* 4th ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2011. p. 120-5
23. MacIntyre NR. Tissue hypoxia: implications for the respiratory clinician. *Respir care.* 2014;59(10):1590–6.
24. Prabhakar NR, Semenza GL. Oxygen sensing and homeostasis. *Physiology.* 2015;30(5):340–8.
25. Ilic M, Grujicic Sipetic S, Ristic B, Ilic I. Myocardial infarction and alcohol consumption: a case-control study. *PLOS ONE.* 2018 (cited 2018 November 5);13(6): Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5986147/>
26. Kasote DM, Katyare SS, Hegde MV, Bae H. Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. *Int J Biol Sci.* 2015;11(8):982–91.
27. Kurutas EB. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutr J.* 2015 (cited 2018 Oct 27);15(1). Available from:
<http://nutritionj.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12937-016-0186-5>
28. Akula R, Ravishankar GA. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal Behav.* 2011;6(11):1720–31.
29. Satari AH, Zargar MI, Shah WA, Bansal R, Bhat MF. Isolation, molecular identification, phytochemical screening and in vitro anti-oxidant activity of endophytic fungi from achilea millefolium linn. *J Pharmacogn Phytochem.* 2018; 7(4)87-92.

30. Minj E, Britto SJ, Marandi RR, Kindo I, George M. Phytochemical analysis and antimicrobial activity of putranjiva roxburghii wall. *World J Pharm Pharm Sci.* 2015;5(1):1157-66.
31. Glorieux C, Zamocky M, Sandoval JM, Verrax J, Calderon PB. Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. *Free Radic Biol Med.* 2015 ;87:84–97.
32. Turdi S, Han X, Huff AF, Roe ND, Hu N, Gao F, et al. Cardiac-specific overexpression of catalase attenuates lipopolysaccharide-induced myocardial contractile dysfunction: role of autophagy. *Free Radic Biol Med.* 2012 ;53(6):1327–38.
33. Cabigas E, Somasuntharam I, Brown M, Che P, Pendergrass K, Chiang B, et al. over-expression of catalase in myeloid cells confers acute protection following myocardial infarction. *Int J Mol Sci.* 2014;15(5):9036–50.
34. Thangarajan S, Deivasigamani A, Natarajan SS, Krishnan P, Mohanan SK. Neuroprotective activity of l-theanine on 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity in rat striatum. *Int J Neurosci.* 2014;124(9):673–84.
35. Nelson SK, Bose SK, Grunwald GK, Myhill P, McCord JM. The induction of human superoxide dismutase and catalase in vivo: a fundamentally new approach to antioxidant therapy. *Free Radic Biol Med.* 2006;40(2):341–7.
36. Brown PN, Murch SJ, Shipley P. phytochemical diversity of cranberry (*vaccinium macrocarpon aiton*) cultivars by anthocyanin determination and metabolomic profiling with chemometric analysis. *J Agric Food Chem.* 2012 ;60(1):261–71.
37. Coates PM, Betz JM, Blackman MR, Cragg GM, Levine M, Moss J, et al. *Encyclopedia of dietary supplements.* 2nd Ed. London: Informa Healthcare; 2010.p.193-201
38. McKay DL, Blumberg JB. Cranberries (*vaccinium macrocarpon*) and cardiovascular disease risk factors. *Nutr Rev.* 2008;65(11):490–502.
39. Sun J, Liu W, Ma H, Marais JPJ, Khoo C, Dain JA, et al. Effect of cranberry (*vaccinium macrocarpon*) oligosaccharides on the formation of advanced glycation end-products. *J Berry Res.* 2016;6(2):149–58.
40. United State Department of Agriculture. *Vaccinium macrocarpon Aiton.* (cited 2018 Oct 27). Available from: <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=VAMA>
41. Gafner S, Brendler T. Adulteration of cranberry (*vaccinium macrocarpon*). botanical adulterants bulletin. 2017 (cited 2018 Oct 27). Available from: https://www.researchgate.net/publication/321913401_Adulteration_of_Cranberry_Vaccinium_macrocarpon
42. Sasidharan S, Chen Y, Saravanan D, Sundram K, Latha L. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2010(cited 2018 Oct 27);8(1): Available from: <http://www.ajol.info/index.php/ajtcam/article/view/60483>
43. Pandey A, Tripathi S. Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. *J Pharmacogn Phytochem.* 2014;2(5):115–9.
44. Azwanida NN. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med Aromat Plants.* 2015 (cited 2018 Oct 27);04(03): Available from: <http://www.omicsgroup.org/journals/a-review->

on-the-extraction-methods-use-in-medicinal-plants-principle-strength-and-limitation-2167-0412-1000196.php?aid=58448

45. De Monte C, Carradori S, Granese A, Di Pierro GB, Leonardo C, De Nunzio C. Modern extraction techniques and their impact on the pharmacological profile of *Serenoa repens* extracts for the treatment of lower urinary tract symptoms. *BMC Urol.* 2014 (cited 2018 Oct 27);14(1). Available from: <http://bmcurol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2490-14-63>
46. Johnson M. Laboratory mice and rats. *mater methods.* 2012 (cited 2018 Nov 6);2: Available from: <http://www.labome.com/method/Laboratory-Mice-and-Rats.html>
47. Vallender EJ, Miller GM. Nonhuman primate models in the genomic era: a paradigm shift. *ILAR J.* 2013;54(2):154–65.
48. Törnqvist E, Annas A, Granath B, Jalkestén E, Cotgreave I, Öberg M. Strategic focus on 3r principles reveals major reductions in the use of animals in pharmaceutical toxicity testing. *PLoS ONE.* 2014 (cited 2019 Oct 30);9(7): Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0101638>
49. Tannenbaum J, Bennett BT. Russell and burch's 3rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2015;54(2):13.
50. NCBI taxonomy database. *Rattus norvegicus.* (cited 2018 Nov 7). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=10116&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock&lin=s&log_op=lineage_toggle
51. Federer W. *Experimental design: theory and application.* New York: MacMillan Publishers; 1963.
52. Harborne JB. *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis.* London; New York: Chapman and Hall; 1980.
53. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *nature.* 1958;181(4617):1199–200.
54. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic.* 1965;16:144–58.
55. Patel RK, Patel JB, Trivedi PD. Spectrophotometric method for the estimation of total alkaloids in the *tinospora cordifolia* m. and its herbal formulations. 2015. 7(10):249-51.
56. Meyer B, Ferrigni N, Putnam J, Jacobsen L, Nichols D, McLaughlin J. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* 1982;45(5):31–4.
57. Maté MJ, Zamocky M, Nykyri LM, Herzog C, Alzari PM, Betzel C, et al. Structure of catalase-a from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol.* 1999 ;286(1):135–49.
58. Warburg O, Christian W. *Biochem. Z.* 1942;310:384–421.
59. Krishnaeswari V, Manikandan S, Vijayakumar J. Bioactive components of *Vaccinium macrocarpon* and its antioxidant activity: an in-vitro study. *Int J Pharm Sci & Res.* 2019;10(1):438–44.

60. Booth NL, Kruger CL, Wallace Hayes A, Clemens R. An innovative approach to the safety evaluation of natural products: Cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Aiton) leaf aqueous extract as a case study. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(9):3150–65.
61. Ma H, Johnson S, Liu W, DaSilva N, Meschwitz S, Dain J, et al. Evaluation of polyphenol anthocyanin-enriched extracts of blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry for free radical scavenging, reactive carbonyl species trapping, anti-glycation, anti- β -amyloid aggregation, and microglial neuroprotective effects. *Int J Mol Sci.* 2018 (cited 2019 Apr 3);19(2): Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5855683/>
62. Kalın P, Gülçin İ, Gören AC. Antioxidant activity and polyphenol content of cranberries (*Vaccinium macrocarpon*). *Rec. Nat. Prod.* 2015. 9(4):496-502.
63. Dewi LT, Adnyana MO, Mahdi C, Prasetyawan S. Study of antocyanins activity from purple sweet potato for reducing apoptotic cells expression of the cerebellum on ischemic stroke rats. *J Pure Appl Chem Res.* 2018;7(2):94–9.
64. Zheng W, Wang SY. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. *J Agric Food Chem.* 2003;51(2):502–9.
65. Tian Y, Zhang C, Guo M. Comparative study on alkaloids and their anti-proliferative activities from three zanthoxylum species. *BMC Complement Altern Med.* 2017;17(1):460.
66. Mbwambo ZH, Moshi MJ, Masimba PJ, Kapingu MC, Nondo RS. Antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of extracts of *Terminalia brownii* roots and stem. *BMC Complement Altern Med.* 2007;7(1):9.
67. Pisutthanan S, Plianbangchang P, Pisutthanan N, Ruanruay S, Muanrit O. Brine Shrimp lethality activity of Thai medicinal plants in the family Meliaceae. *Naresuan Univ J.* 2004;12(2):13–8.
68. Krishnaraju AV, Rao TVN, Sundararaju D, Vanisree M, Tsay H-S, Subbaraju GV. Assessment of bioactivity of Indian medicinal plants using brine shrimp (*Artemia salina*) lethality assay. *Int J Appl Sci Eng.* 2005;3(2):125–34.
69. Chen Z-H, Saito Y, Yoshida Y, Niki E. Effect of oxygen concentration on free radical-induced cytotoxicity. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2008;72(6):1491–7.
70. Song J, Yoon D, Christensen RD, Horvathova M, Thiagarajan P, Prchal JT. HIF-mediated increased ROS from reduced mitophagy and decreased catalase causes necrocytolysis. *J Mol Med.* 2015;93(8):857–66.
71. Bouayed J, Bohn T. Exogenous antioxidants—double-edged swords in cellular redox state: health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxid Med Cell Longev.* 2010 (cited 2019 May 20);3(4): Available from: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2010/267025/abs/>
72. Hodyc D, Johnson E, Skoumalová A, Tkaczyk J, Maxová H, Vízek M, et al. Reactive Oxygen species production in the early and later stage of chronic ventilatory hypoxia. 2012;61:7.
73. Coulic V, Queron S. An alternative technique for heart lesion in the rat: a step to fetal heart implantation for cardiac tissue repair running title: a new

technique of heart lesion in rat. *J Transplant Technol Res.* 2015 (cited 2019 May 23);5(2). Available from: <https://www.omicsonline.org/open-access/an-alternative-technique-for-heart-lesion-in-the-rat-a-step-to-fetal-heartimplantation-for-cardiac-tissue-repair-running-title-a-n-2161-0991-1000149.php?aid=65567>

74. Buja, LM. Coronary artery disease: pathological anatomy and pathogenesis. In: Willerson JT, Holmes, DR, editors. *Coronary Artery Disease*. London: Springer London; 2015. p. 1–20.

LAMPIRAN

Lampiran 1 Persetujuan etik



KOMISI ETIK RISET
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS TRISAKTI
Jalan Kyai Tapa, Grogol, (Kampus B) Jakarta 11440
Telp: (021) 5672731, 5655786
Fax : (021) 5660706

PERSETUJUAN ETIK *Ethical Clearance* Nomor: 135/KER/FK/XII/2018

Komisi Etik Riset Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti setelah mempelajari dengan seksama dan mendengarkan penjelasan dari peneliti utama tentang kemungkinan adanya dampak etis terhadap subyek riset, masyarakat dan lingkungan, menetapkan penelitian dengan judul:

"PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BUAH KRANBERI (*Vaccinium macrocarpon Aiton*) TERHADAP STRES OKSIDATIF PADA ORGAN TIKUS *Sprague Dawley* (PARU, JANTUNG, HATI, GINJAL DAN OTAK) YANG DIINDUKSI HIPOKSIA"

Peneliti Utama : Kelvin

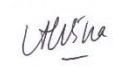
Lembaga/Tempat penelitian : FK Universitas Tarumanagara

Dinyatakan memenuhi persyaratan etik untuk dilaksanakan.

Jakarta, 18 Desember 2018

Ketua

Prof. DR dr. Adi Hidayat, MS

Sekretaris

dr. Alvina SpPK

Lampiran 2 Hasil identifikasi tumbuhan



LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
(INDONESIAN INSTITUTE OF SCIENCES)
PUSAT PENELITIAN BIOLOGI
(RESEARCH CENTER FOR BIOLOGY)

Cibinong Science Center, Jl. Raya Jakarta - Bogor KM. 46 Cibinong 16911
Telp. (+62 21) 87907636 - 87907604, Fax. 87907612
Website : www.biologi.lipi.go.id



Cibinong, 7 Agustus 2018

Nomor : /292/IPH.1.01/If.07/VIII/2018
Lampiran : -
Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.
Bpk./Ibu/Sdr(j). **Chindy Tjandra**
Mhs. Univ. Tarumanagara
Jl. Letjend S. Parman No.1
Jakarta - 11440

Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang Saudara kirimkan ke "Herbarium Bogoriense", Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor, adalah sebagai berikut :

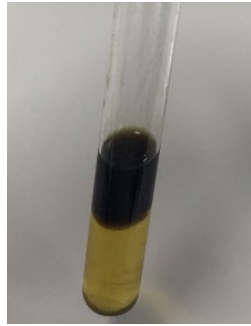
No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1	Cranberry	<i>Vaccinium macrocarpon</i> Aiton	Ericaceae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

Kepala Bidang Botani
Pusat Penelitian Biologi-LIPI,


Dr. Joeni Setiyo Rahajoe
NIP. 196706241993032004

Lampiran 3 Hasil pengujian



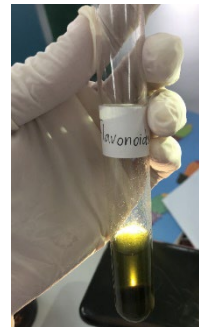
Uji fitokimia *alkaloids*



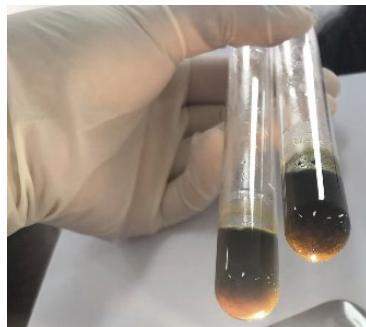
Uji fitokimia *coumarins*



Uji fitokimia *phenols*



Uji fitokimia *flavonoids*



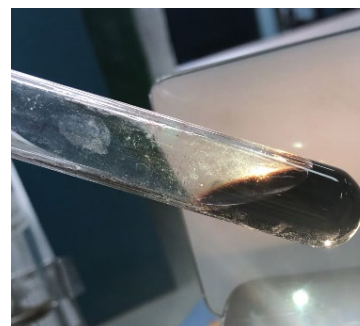
Uji fitokimia *anthocyanin* dan
betacyanin



Uji fitokimia *glycosides*



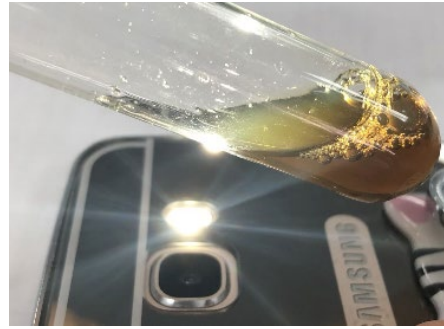
Uji fitokimia *cardio glycosides*



Uji fitokimia *quinones*



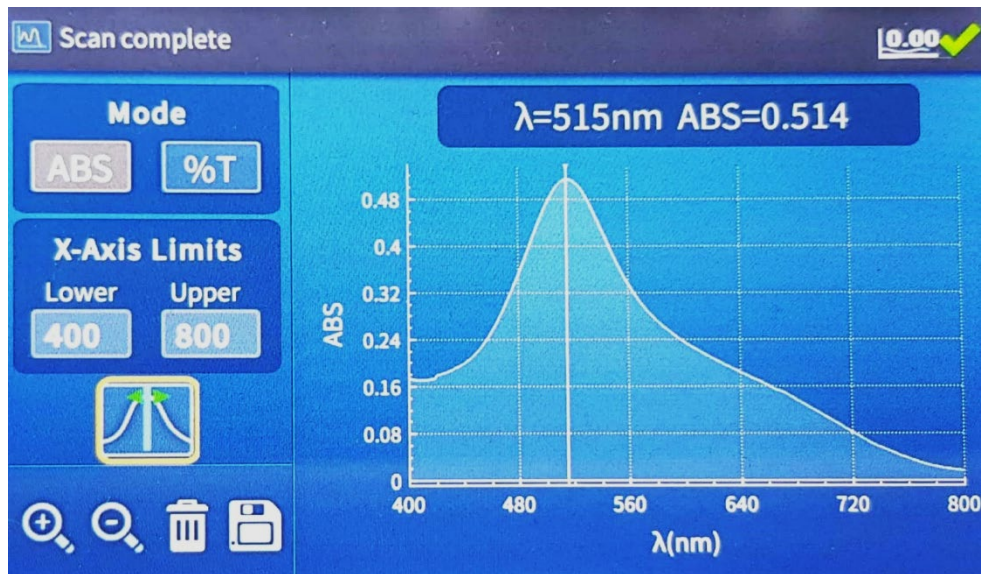
Uji fitokimia *steroids*



Uji fitokimia *tannins*



Uji fitokimia *terpenoids*



Absorbansi maksimum DPPH

Regresi linear kapasitas antioksidan ekstrak buah kranberi

Best-fit values \pm SE	
Slope	0.8152 \pm 0.1416
Y-intercept	9.436 \pm 8.135
X-intercept	-11.58
1/slope	1.227
95% Confidence Intervals	
Slope	0.3645 to 1.266
Y-intercept	-16.45 to 35.32
X-intercept	-91.17 to 13.82
Goodness of Fit	
R square	0.917
Sy.x	8.956
Is slope significantly non-zero?	
F	33.14
DFn, DFd	1, 3
P value	0.0104
Deviation from zero?	Significant
Equation	$Y = 0.8152 * X + 9.436$
Data	
Number of X values	5
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	5
Number of missing values	0

Regresi linear kapasitas antioksidan asam askorbat

Best-fit values \pm SE	
Slope	6.381 \pm 0.1261
Y-intercept	19.49 \pm 0.8363
X-intercept	-3.055
1/slope	0.1567
95% Confidence Intervals	
Slope	5.98 to 6.783
Y-intercept	16.83 to 22.16
X-intercept	-3.69 to -2.492
Goodness of Fit	
R square	0.9988
Sy.x	0.7974
Is slope significantly non-zero?	
F	2562
DFn, DFd	1, 3
P value	<0.0001
Deviation from zero?	Significant

Equation	$Y = 6.381 * X + 19.49$
Data	
Number of X values	5
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	5
Number of missing values	0

Regresi linear standar *tannin* fenolik

Best-fit values \pm SE	
Slope	0.00091 \pm 6.285e-005
Y-intercept	0.0664 \pm 0.03266
X-intercept	-72.97
1/slope	1099
95% Confidence Intervals	
Slope	0.00071 to 0.00111
Y-intercept	-0.03754 to 0.1703
X-intercept	-238.2 to 34.07
Goodness of Fit	
R square	0.9859
Sy.x	0.01988
Is slope significantly non-zero?	
F	209.6
DFn, DFd	1, 3
P value	0.0007
Deviation from zero?	Significant
Equation	Y = 0.00091*X + 0.0664
Data	
Number of X values	5
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	5
Number of missing values	0

Regresi linier standar *berberine chloride* alkaloid

Best-fit values \pm SE	
Slope	0.001715 \pm 0.0002174
Y-intercept	0.0481 \pm 0.01442
X-intercept	-28.05
1/slope	583.1
95% Confidence Intervals	
Slope	0.001023 to 0.002407
Y-intercept	0.002209 to 0.09399
X-intercept	-89.38 to -0.9434
Goodness of Fit	
R square	0.954
Sy.x	0.01375
Is slope significantly non-zero?	
F	62.24
DFn, DFd	1, 3
P value	0.0042
Deviation from zero?	Significant

Equation	$Y = 0.001715 * X + 0.0481$
Data	
Number of X values	5
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	5
Number of missing values	0

Regresi linear toksisitas

Best-fit values \pm SE	
Slope	0.001715 \pm 0.0002174
Y-intercept	0.0481 \pm 0.01442
X-intercept	-28.05
1/slope	583.1
95% Confidence Intervals	
Slope	0.001023 to 0.002407
Y-intercept	0.002209 to 0.09399
X-intercept	-89.38 to -0.9434
Goodness of Fit	
R square	0.954
Sy.x	0.01375
Is slope significantly non-zero?	
F	62.24
DFn, DFd	1, 3
P value	0.0042
Deviation from zero?	Significant
Equation	$Y = 0.001715 * X + 0.0481$
Data	
Number of X values	5
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	5
Number of missing values	0

Optimasi waktu dan pengenceran homogenat organ jantung uji

Waktu (menit)	Blanko	Rata-rata Kecepatan Reaksi Pengenceran Sampel (ΔV)			
		10x	25x	50x	100x
1	0.706	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
2	0.705	0.0020	0.0010	0.0010	-0.0050
3	0.705	0.0035	0.0015	0.0025	-0.0045
4	0.705	0.0037	0.0017	0.0030	-0.0043
5	0.705	0.0038	0.0023	0.0038	-0.0035
6	0.705	0.0040	0.0024	0.0042	-0.0030
7	0.705	0.0040	0.0023	0.0043	-0.0025
8	0.705	0.0039	0.0024	0.0043	-0.0021
9	0.705	0.0039	0.0025	0.0044	-0.0018
10	0.706	0.0040	0.0026	0.0046	-0.0014

Optimasi waktu dan pengenceran homogenat organ jantung kontrol

Waktu (menit)	Blanko	Rata-rata Kecepatan Reaksi Pengenceran Sampel (ΔV)			
		5x	10x	15x	20x
1	0.706	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
2	0.705	0.0240	0.0020	0.0120	0.0090
3	0.705	0.0230	0.0035	0.0115	0.0090
4	0.705	0.0210	0.0037	0.0113	0.0087
5	0.705	0.0210	0.0038	0.0110	0.0090
6	0.705	0.0198	0.0040	0.0106	0.0088
7	0.705	0.0185	0.0040	0.0103	0.0087
8	0.705	0.0171	0.0039	0.0101	0.0086
9	0.705	0.0163	0.0039	0.0099	0.0085
10	0.706	0.0153	0.0040	0.0098	0.0084

Optimasi waktu dan pengenceran lisat darah 50% uji

Waktu (menit)	Blanko	Rata-rata Kecepatan Reaksi Pengenceran Lisat Darah (ΔV)			
		10x	25x	50x	100x
1	0.706	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
2	0.705	0.0020	0.0010	0.0010	-0.0050
3	0.705	0.0035	0.0015	0.0025	-0.0045
4	0.705	0.0037	0.0017	0.0030	-0.0043
5	0.705	0.0038	0.0023	0.0038	-0.0035
6	0.705	0.0040	0.0024	0.0042	-0.0030
7	0.705	0.0040	0.0023	0.0043	-0.0025
8	0.705	0.0039	0.0024	0.0043	-0.0021
9	0.705	0.0039	0.0025	0.0044	-0.0018
10	0.706	0.0040	0.0026	0.0046	-0.0014

Optimasi waktu dan pengenceran lisat darah 50% kontrol

Waktu (menit)	Blanko	Rata-rata Kecepatan Reaksi Pengenceran Lisat Darah (ΔV)			
		5x	10x	15x	20x
1	0.706	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
2	0.705	0.0060	0.0050	0.0050	0.0020
3	0.705	0.0120	0.0050	0.0050	0.0025
4	0.705	0.0133	0.0057	0.0053	0.0023
5	0.705	0.0135	0.0055	0.0055	0.0023
6	0.705	0.0128	0.0054	0.0058	0.0024
7	0.705	0.0118	0.0052	0.0060	0.0022
8	0.705	0.0114	0.0053	0.0059	0.0021
9	0.705	0.0115	0.0053	0.0058	0.0021
10	0.706	0.0113	0.0053	0.0058	0.0023

Regresi linear standar protein

Best-fit values \pm SE	
Slope	0.8335 \pm 0.02395
Y-intercept	0.05981 \pm 0.01024
X-intercept	-0.07177
1/slope	1.2
95% Confidence Intervals	
Slope	0.7748 to 0.8921
Y-intercept	0.03475 to 0.08488
X-intercept	-0.1081 to -0.03948
Goodness of Fit	
R square	0.9951
Sy.x	0.01806
Is slope significantly non-zero?	
F	1211
DFn, DFd	1, 6
P value	<0.0001
Deviation from zero?	Significant
Equation	$Y = 0.8335 * X + 0.05981$
Data	
Number of X values	8
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	8
Number of missing values	0

Aktivitas enzim katalase, kadar protein, dan aktivitas spesifik enzim katalase homogenat jantung

Kelompok	Durasi Hipoksia	Tikus	Aktivitas Enzim Katalase (U/mg)	Kadar Protein	Aktivitas Spesifik Enzim Katalase (U/mg Protein)
Uji	Normoksia	1	0.1353717	16.09884837	0.00840878
		2	0.167537	21.85700576	0.00766514
		3	0.181716	18.61804223	0.00976021
		4	0.1427783	17.77831094	0.00803104
	1 hari	1	0.07908182	12.02015355	0.0065791
		2	0.16374384	23.05662188	0.00710181
		3	0.18484655	24.73608445	0.00747275
		4	0.126249	17.4184261	0.00724801
	7 hari	1	0.13448052	21.61708253	0.00622103
		2	0.20210427	28.57485605	0.0070728
		3	0.11361609	17.4184261	0.00652275
		4	0.24151158	33.0134357	0.00731555
	14 hari	1	0.13710483	19.45777351	0.00704628
		2	0.12128825	19.81765835	0.00612021
		3	0.11125425	19.09788868	0.00582547
		4	0.14274726	19.21785029	0.00742785
Kontrol	Normoksia	1	0.0922685	14.29942418	0.0064526
		2	0.0880714	11.30038388	0.0077937
		3	0.1061076	14.17946257	0.0074832
		4	0.0847367	13.25975688	0.0063905
	1 hari	1	0.0821382	13.4596929	0.0061025
		2	0.095	14.97920665	0.0063421
		3	0.0677898	13.21976967	0.0051279
		4	0.1101699	18.25815739	0.006034
	7 hari	1	0.096857	17.17850288	0.0056383
		2	0.0717519	11.06046065	0.0064872
		3	0.0813748	14.29942418	0.0056908
		4	0.0839805	17.4184261	0.0048214
	14 hari	1	0.1317475	21.85700576	0.0060277
		2	0.0766656	15.49904031	0.0049465
		3	0.0912903	17.53838772	0.0052052
		4	0.104771	18.29814459	0.0057258

Aktivitas enzim katalase, kadar protein, dan aktivitas spesifik enzim katalase lisat darah 50%

Kelompok	Durasi Hipoksia	Tikus	Aktivitas Enzim Katalase (U/mg)	Kadar Protein	Aktivitas Spesifik Enzim Katalase (U/mg Protein)
Uji	Normoksia	1	0.04136	0.550864	0.075083
		2	0.027574	0.34333	0.080312
		3	0.030331	0.504079	0.060171
		4	0.025735	0.411708	0.062509
	1 hari	1	0.027574	0.457893	0.060218
		2	0.020221	0.360425	0.056102
		3	0.014706	0.327735	0.044871
		4	0.011949	0.222169	0.053781
	7 hari	1	0.024816	0.508577	0.048795
		2	0.027574	0.493582	0.055864
		3	0.019301	0.447997	0.043084
		4	0.023897	0.483385	0.049437
	14 hari	1	0.023897	0.494782	0.048298
		2	0.026654	0.524172	0.05085
		3	0.011949	0.328935	0.036325
		4	0.007353	0.330734	0.022232
Kontrol	Normoksia	1	0.022059	0.349328	0.063146
		2	0.020221	0.391915	0.051594
		3	0.036765	0.726607	0.050598
		4	0.023897	0.600948	0.039766
	1 hari	1	0.011029	0.296545	0.037193
		2	0.016544	0.359525	0.046017
		3	0.008272	0.308541	0.02681
		4	0.006434	0.221569	0.029038
	7 hari	1	0.014706	0.377519	0.038954
		2	0.011029	0.432702	0.02549
		3	0.013787	0.332534	0.04146
		4	0.009191	0.458493	0.020046
	14 hari	1	0.005515	0.367622	0.015001
		2	0.017463	0.461792	0.037816
		3	0.008272	0.37542	0.022034
		4	0.011029	0.379319	0.029077

Uji statistik kolom pada jantung tikus kelompok uji

	Normoksia	Hipoksia 1 hari	Hipoksia 7 hari	Hipoksia 14 hari
Number of values	4	4	4	4
Minimum	7.665	6.579	6.221	5.825
25% Percentile	7.757	6.71	6.296	5.899
Median	8.22	7.175	6.798	6.583
75% Percentile	9.422	7.417	7.255	7.332
Maximum	9.76	7.473	7.316	7.428
Mean	8.466	7.1	6.783	6.605
Std. Deviation	0.9145	0.3796	0.5004	0.756
Std. Error of Mean	0.4572	0.1898	0.2502	0.378
Lower 95% CI of mean	7.011	6.496	5.987	5.402
Upper 95% CI of mean	9.921	7.704	7.579	7.808
Sum	33.87	28.4	27.13	26.42
Shapiro-Wilk normality test				
W	0.9001	0.9433	0.9477	0.9191
P value	0.4314	0.6744	0.7019	0.5318
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns

Uji statistik kolom pada jantung tikus kelompok kontrol

	Normoksia	Hipoksia 1 hari	Hipoksia 7 hari	Hipoksia 14 hari
Number of values	4	4	4	4
Minimum	6.391	5.128	4.821	4.946
25% Percentile	6.406	5.354	5.026	5.011
Median	6.968	6.068	5.665	5.465
75% Percentile	7.716	6.282	6.288	5.952
Maximum	7.794	6.342	6.487	6.028
Mean	7.03	5.902	5.659	5.476
Std. Deviation	0.7143	0.5325	0.6805	0.4901
Std. Error of Mean	0.3572	0.2662	0.3402	0.245
Lower 95% CI of mean	5.893	5.054	4.577	4.696
Upper 95% CI of mean	8.167	6.749	6.742	6.256
Sum	28.12	23.61	22.64	21.91
Shapiro-Wilk normality test				

W	0.8426	0.8412	0.9581	0.9554
P value	0.2031	0.1990	0.7670	0.7500
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns

Uji statistik kolom pada darah tikus kelompok uji

	Normoksia	Hipoksia 1 hari	Hipoksia 7 hari	Hipoksia 14 hari
Number of values	4	4	4	4
Minimum	60.17	44.87	43.08	22.23
25% Percentile	60.76	47.1	44.51	25.76
Median	68.8	54.94	49.12	42.31
75% Percentile	79	59.19	54.26	50.21
Maximum	80.31	60.22	55.86	50.85
Mean	69.52	53.74	49.3	39.43
Std. Deviation	9.729	6.486	5.228	13.1
Std. Error of Mean	4.865	3.243	2.614	6.548
Lower 95% CI of mean	54.04	43.42	40.98	18.59
Upper 95% CI of mean	85	64.06	57.61	60.26
Sum	278.1	215	197.2	157.7
Shapiro-Wilk normality test				
W	0.894	0.9472	0.9638	0.9119
P value	0.4021	0.6987	0.8029	0.4925
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns

Uji statistik kolom pada darah tikus kelompok kontrol

	Normoksia	Hipoksia 1 hari	Hipoksia 7 hari	Hipoksia 14 hari
Number of values	4	4	4	4
Minimum	39.77	26.81	20.05	15
25% Percentile	42.47	27.37	21.41	16.76
Median	51.1	33.12	32.22	25.56
75% Percentile	60.26	43.81	40.83	35.63
Maximum	63.15	46.02	41.46	37.82
Mean	51.28	34.76	31.49	25.98
Std. Deviation	9.556	8.729	10.36	9.76
Std. Error of Mean	4.778	4.364	5.181	4.88
Lower 95% CI of mean	36.07	20.87	15	10.45
Upper 95% CI of mean	66.48	48.65	47.97	41.51
Sum	205.1	139.1	125.9	103.9

Shapiro-Wilk normality test				
W	0.9621	0.927	0.8927	0.9936
P value	0.7918	0.5769	0.3958	0.9753
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns

t-test aktivitas spesifik katalase jantung pada tikus kelompok uji perlakuan normoksia dengan hipoksia 1 hari

Table Analyzed	Aktivitas Spesifik Katalase Kelompok Uji Jantung
Column B vs. Column A	Hipoksia 1 Hari vs. Normoksia
Unpaired t test	
P value	0.0329
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.759 df=6
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	8.466 ± 0.4572, n=4
Mean ± SEM of column B	7.1 ± 0.1898, n=4
Difference between means	-1.366 ± 0.4951
95% confidence interval	-2.577 to -0.1545
R squared (eta squared)	0.5592

t-test aktivitas spesifik katalase jantung pada tikus kelompok uji perlakuan normoksia dengan hipoksia 7 hari

Table Analyzed	Aktivitas Spesifik Katalase Kelompok Uji Jantung
Column C vs. Column A	Hipoksia 7 Hari vs. Normoksia
Unpaired t test	
P value	0.0179
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.23 df=6
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	8.466 ± 0.4572, n=4

Mean \pm SEM of column C	6.783 \pm 0.2502, n=4
Difference between means	-1.683 \pm 0.5212
95% confidence interval	-2.959 to -0.4079
R squared (eta squared)	0.6348

t-test aktivitas spesifik katalase jantung pada tikus kelompok uji perlakuan normoksia dengan hipoksia 14 hari

Table Analyzed	Aktivitas Spesifik Katalase Kelompok Uji Jantung
Column D vs. Column A	Hipoksia 14 Hari vs. Normoksia
Unpaired t test	
P value	0.0201
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.138 df=6
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	8.466 ± 0.4572, n=4
Mean ± SEM of column D	6.605 ± 0.378, n=4
Difference between means	-1.861 ± 0.5932
95% confidence interval	-3.313 to -0.4097
R squared (eta squared)	0.6213

t-test aktivitas spesifik katalase jantung pada tikus kelompok kontrol perlakuan normoksia dengan hipoksia 1 hari

Table Analyzed	Aktivitas Spesifik Katalase Kelompok Kontrol Jantung
Column B vs. Column A	Hipoksia 1 Hari vs. Normoksia
Unpaired t test	
P value	0.0445
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.533 df=6
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	7.03 ± 0.3572, n=4
Mean ± SEM of column B	5.902 ± 0.2662, n=4
Difference between means	-1.128 ± 0.4455
95% confidence interval	-2.218 to -0.03829
R squared (eta squared)	0.5167

t-test aktivitas spesifik katalase jantung pada tikus kelompok kontrol perlakuan normoksia dengan hipoksia 7 hari

Table Analyzed	Aktivitas Spesifik Katalase Kelompok Kontrol Jantung
Column C vs. Column A	Hipoksia 7 Hari vs. Normoksia
Unpaired t test	
P value	0.0321
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.778 df=6
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	7.03 ± 0.3572, n=4
Mean ± SEM of column C	5.659 ± 0.3402, n=4
Difference between means	-1.371 ± 0.4933
95% confidence interval	-2.578 to -0.1636
R squared (eta squared)	0.5627

t-test aktivitas spesifik katalase jantung pada tikus kelompok kontrol perlakuan normoksia dengan hipoksia 14 hari

Table Analyzed	Aktivitas Spesifik Katalase Kelompok Kontrol Jantung
Column D vs. Column A	Hipoksia 14 Hari vs. Normoksia
Unpaired t test	
P value	0.0115
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.587 df=6
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	7.03 ± 0.3572, n=4
Mean ± SEM of column D	5.476 ± 0.245, n=4
Difference between means	-1.554 ± 0.4331
95% confidence interval	-2.614 to -0.4938
R squared (eta squared)	0.682

t-test aktivitas spesifik katalase darah pada tikus kelompok uji perlakuan normoksia dengan hipoksia 1 hari

Table Analyzed	Aktivitas Spesifik Katalase Kelompok Uji Darah
Column B vs. Column A	Hipoksia 1 Hari vs. Normoksia
Unpaired t test	
P value	0.0357
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.698 df=6
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	69.52 ± 4.865, n=4
Mean ± SEM of column B	53.74 ± 3.243, n=4
Difference between means	-15.78 ± 5.847
95% confidence interval	-30.08 to -1.469
R squared (eta squared)	0.5482

t-test aktivitas spesifik katalase darah pada tikus kelompok uji perlakuan normoksia dengan hipoksia 7 hari

Table Analyzed	Aktivitas Spesifik Katalase Kelompok Uji Darah
Column C vs. Column A	Hipoksia 7 Hari vs. Normoksia
Unpaired t test	
P value	0.0106
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.662 df=6
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	69.52 ± 4.865, n=4
Mean ± SEM of column C	49.3 ± 2.614, n=4
Difference between means	-20.22 ± 5.522
95% confidence interval	-33.74 to -6.71
R squared (eta squared)	0.6909

t-test aktivitas spesifik katalase darah pada tikus kelompok uji perlakuan normoksia dengan hipoksia 14 hari

Table Analyzed	Aktivitas Spesifik Katalase Kelompok Uji Darah
Column D vs. Column A	Hipoksia 14 Hari vs. Normoksia
Unpaired t test	
P value	0.0102
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.689 df=6
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	69.52 ± 4.865, n=4
Mean ± SEM of column D	39.43 ± 6.548, n=4
Difference between means	-30.09 ± 8.157
95% confidence interval	-50.05 to -10.13
R squared (eta squared)	0.694

t-test aktivitas spesifik katalase darah pada tikus kelompok kontrol perlakuan normoksia dengan hipoksia 1 hari

Table Analyzed	Aktivitas Spesifik Katalase Kelompok Kontrol Darah
Column B vs. Column A	Hipoksia 1 Hari vs. Normoksia
Unpaired t test	
P value	0.0434
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.552 df=6
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	51.28 ± 4.778, n=4
Mean ± SEM of column B	34.76 ± 4.364, n=4
Difference between means	-16.51 ± 6.471
95% confidence interval	-32.35 to -0.677
R squared (eta squared)	0.5204

t-test aktivitas spesifik katalase darah pada tikus kelompok kontrol perlakuan normoksia dengan hipoksia 7 hari

Table Analyzed	Aktivitas Spesifik Katalase Kelompok Kontrol Darah
Column C vs. Column A	Hipoksia 7 Hari vs. Normoksia
Unpaired t test	
P value	0.0308
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.808 df=6
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	51.28 ± 4.778, n=4
Mean ± SEM of column C	31.49 ± 5.181, n=4
Difference between means	-19.79 ± 7.048
95% confidence interval	-37.03 to -2.544
R squared (eta squared)	0.5678

t-test aktivitas spesifik katalase darah pada tikus kelompok kontrol perlakuan normoksia dengan hipoksia 14 hari

Table Analyzed	Aktivitas Spesifik Katalase Kelompok Kontrol Darah
Column D vs. Column A	Hipoksia 14 Hari vs. Normoksia
Unpaired t test	
P value	0.0100
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.703 df=6
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	51.28 ± 4.778, n=4
Mean ± SEM of column D	25.98 ± 4.88, n=4
Difference between means	-25.29 ± 6.83
95% confidence interval	-42.01 to -8.582
R squared (eta squared)	0.6957

t-test aktivitas spesifik katalase jantung pada tikus perlakuan normoksia kelompok uji dengan kelompok kontrol

Table Analyzed	Aktivitas Spesifik Katalase Jantung Uji - Kontrol
Column E vs. Column A	Uji Normoksia vs. Kontrol Normoksia
Unpaired t test	
P value	0.0481
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.475 df=6
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	7.03 ± 0.3572, n=4
Mean ± SEM of column E	8.466 ± 0.4572, n=4
Difference between means	1.436 ± 0.5802
95% confidence interval	0.01658 to 2.856
R squared (eta squared)	0.5053

t-test aktivitas spesifik katalase jantung pada tikus perlakuan hipoksia 1 hari kelompok uji dengan kelompok kontrol

Table Analyzed	Aktivitas Spesifik Katalase Jantung Uji - Kontrol
Column F vs. Column B	Uji Hipoksia 1 Hari vs. Kontrol Hipoksia 1 Hari
Unpaired t test	
P value	0.0105
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.667 df=6
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column B	5.902 ± 0.2662, n=4
Mean ± SEM of column F	7.1 ± 0.1898, n=4
Difference between means	1.199 ± 0.3269
95% confidence interval	0.3988 to 1.999
R squared (eta squared)	0.6914

t-test aktivitas spesifik katalase jantung pada tikus perlakuan hipoksia 7 hari kelompok uji dengan kelompok kontrol

Table Analyzed	Aktivitas Spesifik Katalase Jantung Uji - Kontrol
Column G vs. Column C	Uji Hipoksia 7 Hari vs. Kontrol Hipoksia 7 Hari
Unpaired t test	
P value	0.0375
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.661 df=6
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column C	5.659 ± 0.3402, n=4
Mean ± SEM of column G	6.783 ± 0.2502, n=4
Difference between means	1.124 ± 0.4223
95% confidence interval	0.09025 to 2.157
R squared (eta squared)	0.5412

t-test aktivitas spesifik katalase jantung pada tikus perlakuan hipoksia 14 hari kelompok uji dengan kelompok kontrol

Table Analyzed	Aktivitas Spesifik Katalase Jantung Uji - Kontrol
Column H vs. Column D	Uji Hipoksia 14 Hari vs. Kontrol Hipoksia 14 hari
Unpaired t test	
P value	0.0462
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.506 df=6
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column D	5.476 ± 0.245, n=4
Mean ± SEM of column H	6.605 ± 0.378, n=4
Difference between means	1.129 ± 0.4505
95% confidence interval	0.02643 to 2.231
R squared (eta squared)	0.5113

t-test aktivitas spesifik katalase darah pada tikus perlakuan normoksia kelompok uji dengan kelompok kontrol

Table Analyzed	Aktivitas Spesifik Katalase Darah Uji - Kontrol
Column E vs. Column A	Uji Normoksia vs. Kontrol Normoksia
Unpaired t test	
P value	0.0368
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.675 df=6
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	51.28 ± 4.778, n=4
Mean ± SEM of column E	69.52 ± 4.865, n=4
Difference between means	18.24 ± 6.819
95% confidence interval	1.558 to 34.93
R squared (eta squared)	0.544

t-test aktivitas spesifik katalase darah pada tikus perlakuan hipoksia 1 hari kelompok uji dengan kelompok kontrol

Table Analyzed	Aktivitas Spesifik Katalase Darah Uji - Kontrol
Column F vs. Column B	Uji Hipoksia 1 Hari vs. Kontrol Hipoksia 1 Hari
Unpaired t test	
P value	0.0130
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.49 df=6
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column B	34.76 ± 4.364, n=4
Mean ± SEM of column F	53.74 ± 3.243, n=4
Difference between means	18.98 ± 5.437
95% confidence interval	5.674 to 32.28
R squared (eta squared)	0.67

t-test aktivitas spesifik katalase darah pada tikus perlakuan hipoksia 7 hari kelompok uji dengan kelompok kontrol

Table Analyzed	Aktivitas Spesifik Katalase Darah Uji - Kontrol
Column G vs. Column C	Uji Hipoksia 7 Hari vs. Kontrol Hipoksia 7 Hari
Unpaired t test	
P value	0.0220
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.069 df=6
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column C	31.49 ± 5.181, n=4
Mean ± SEM of column G	49.3 ± 2.614, n=4
Difference between means	17.81 ± 5.803
95% confidence interval	3.609 to 32.01
R squared (eta squared)	0.6108

t-test aktivitas spesifik katalase darah pada tikus perlakuan hipoksia 14 hari kelompok uji dengan kelompok kontrol

Table Analyzed	Aktivitas Spesifik Katalase Darah Uji - Kontrol
Column H vs. Column D	Uji Hipoksia 14 Hari vs. Kontrol Hipoksia 14 hari
Unpaired t test	
P value	0.1508
P value summary	Ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=1.646 df=6
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column D	25.98 ± 4.88, n=4
Mean ± SEM of column H	39.43 ± 6.548, n=4
Difference between means	13.44 ± 8.166
95% confidence interval	-6.538 to 33.43
R squared (eta squared)	0.3112

Uji korelasi aktivitas spesifik katalase jantung dengan darah kelompok uji

	Jaringan Uji vs. Darah Uji
Pearson r	
r	0.9602
95% confidence interval	-0.01098 to 0.9992
R squared	0.9221
P value	
P (two-tailed)	0.0398
P value summary	*
Significant? (alpha = 0.05)	Yes
Number of XY Pairs	4

Uji korelasi aktivitas spesifik katalase jantung dengan darah kelompok kontrol

	Jaringan Kontrol vs. Darah Kontrol
Pearson r	
r	0.9941
95% confidence interval	0.7415 to 0.9999
R squared	0.9883
P value	
P (two-tailed)	0.0059
P value summary	**
Significant? (alpha = 0.05)	Yes
Number of XY Pairs	4

Lampiran 4 Dokumentasi selama penelitian



Buah kranberi



Proses maserasi



Pemotongan buah kranberi



Penampungan hasil maserasi



Pengeringan buah kranberi



Proses evaporasi



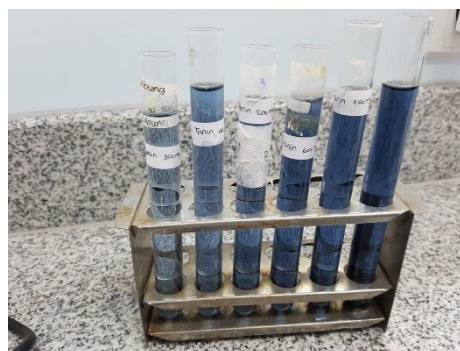
Proses pelarutan ekstrak



Proses uji fenolik



Larutan ekstrak buah kranberi



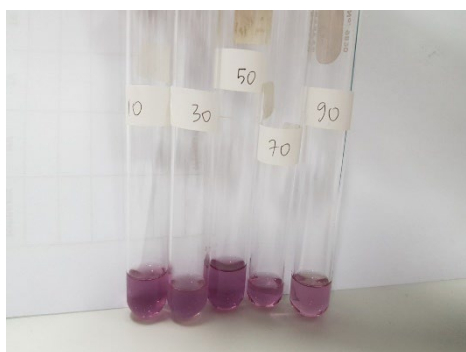
Standar *tannin*



Proses uji kapasitas antioksidan



Hasil uji fenolik



Hasil uji DPPH kranberi



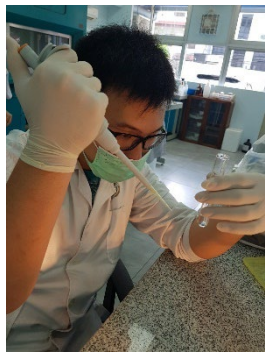
Hasil uji alkaloid



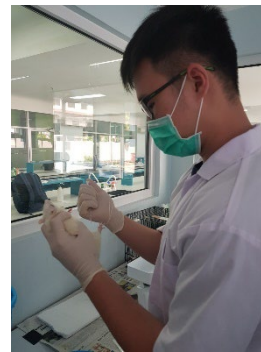
Penetasan larva udang



Pencekohan tikus



Proses uji BSLT



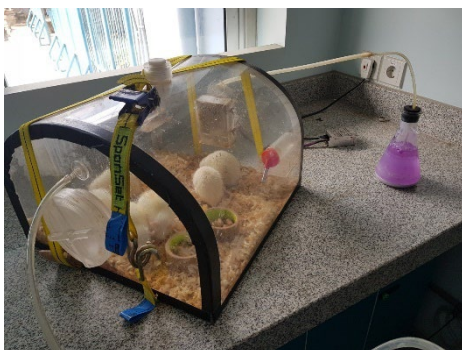
Pembiusan tikus



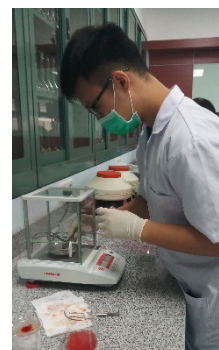
Proses uji BSLT (2)



Proses bedah tikus



Tikus dalam *Hypoxia Chamber*



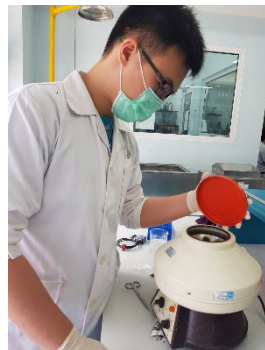
Penimbangan organ



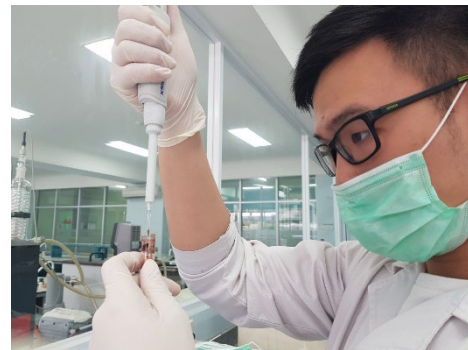
Proses sentrifugasi organ



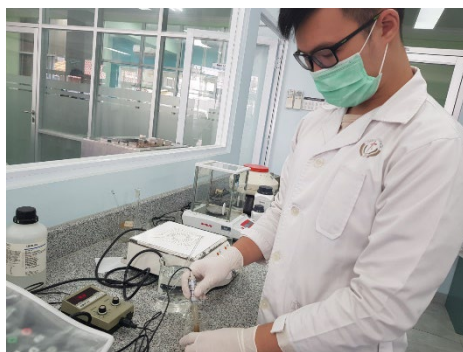
Pembuatan larutan H₂O₂



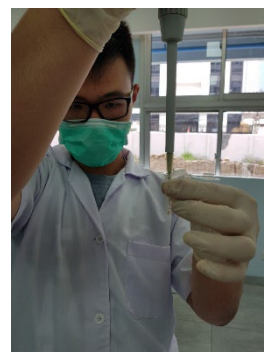
Pembuatan lisat darah 50%



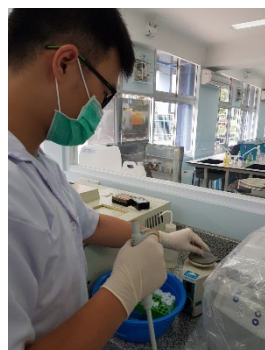
Pengambilan lisat darah 50%



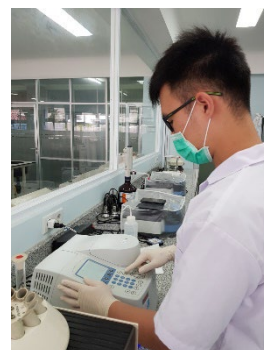
Pembuatan larutan PBS



Pengambilan homogenat jantung



Menggunakan alat *vortex*



Menggunakan spektrofotometer

Lampiran 5 Daftar riwayat hidup

DAFTAR RIWAYAT HIDUP

DATA PRIBADI

1. Nama : Jonathan Edbert Afandy
2. NIM : 405160200
3. Jenis Kelamin : Laki-laki
4. Tempat, Tanggal Lahir : Jakarta, 22 Januari 1998
5. Agama : Katolik
6. Status : Belum Menikah
7. Pendidikan Terakhir : SMA
8. Alamat : Taman Ratu blok F3 no 18, Jakarta Barat
9. Nomor Telepon : 087877372347
10. Email : jonathanedbert@yahoo.co.id

RIWAYAT PENDIDIKAN

- 2016 – sekarang : Universitas Tarumanagara
- 2013 – 2016 : SMAK IPEKA Tomang 2
- 2010 – 2013 : SMPK IPEKA Tomang 2
- 2004 – 2010 : SD Kemurnian 2

RIWAYAT ORGANISASI

- 2018 – 2019 : Ketua BEM FK UNTAR
- 2017 – 2018 : Anggota Divisi PSDM BEM FK UNTAR
- 2017 – 2018 : *Executive Board MnD* AMSA UNTAR
- 2016 – 2017 : Anggota Muda BEM FK UNTAR
- 2016 – 2017 : Anggota *MnD* AMSA UNTAR
- 2013 – 2016 : OSIS SMAK IPEKA Tomang