

**Pengaruh Ekstrak Etanol Ubi Jalar Ungu
(*Ipomoea batatas* L. var. *Ayamurasaki*) Terhadap
Profil Protein dan Ekspresi *Inducible Nitric Oxide
Synthase* (iNOS) pada Jantung Tikus Putih (*Rattus
novergicus*) Model Hipertensi**

SKRIPSI

Oleh :

Kiftiyah Yuni Fatmawardi

145090200111010



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

**Pengaruh Ekstrak Etanol Ubi Jalar Ungu
(*Ipomoea batatas* L. var. *Ayamurasaki*) Terhadap
Profil Protein dan Ekspresi *Inducible Nitric Oxide
Synthase* (iNOS) pada Jantung Tikus Putih (*Rattus
novergicus*) Model Hipertensi**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Kimia

Oleh :

Kiftiyah Yuni Fatmawardi

145090200111010



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Pengaruh Ekstrak Etanol Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas* L. var. *Ayamurasaki*) Terhadap Profil Protein dan Ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) pada Jantung Tikus Putih (*Rattus novergicus*) Model Hipertensi

Oleh :

Kiftiyah Yuni Fatmawardi
145090200111010

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal. **16 Juli 2018**
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar Sarjana
Sains dalam bidang kimia

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001

Dr. Sasangka Prasetyawan, MS
NIP. 19630404 198901 1 001



Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Masuri, S.Si., M.Si., Ph.D
NIP. 19731020 200212 1 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : KIFTIYAH YUNI FATMAWARDI
NIM : 145090200111010
Jurusan : Kimia
Penulis skripsi berjudul :
“Pengaruh Ekstrak Etanol Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas* L. var. *Ayamurasaki*) Terhadap Profil Protein dan Ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) pada Jantung Tikus Putih (*Rattus novergicus*) Model Hipertensi”

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termasuk di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila terbukti dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan segala kesadaran.

Malang, 16 JUL 2018

Yang menyatakan,



Kiftiyah Yuni Fatmawardi
145090200111010

Pengaruh Ekstrak Etanol Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas* L. var. *Ayamurasaki*) Terhadap Profil Protein dan Ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) pada Jantung Tikus Putih (*Rattus novergicus*) Model Hipertensi

ABSTRAK

Hipertensi merupakan salah satu penyakit kardiovaskular yang ditunjukkan dengan tekanan darah sistolik ≥ 140 mmHg dan tekanan darah diastolik ≥ 90 mmHg. Induksi DOCA-salt pada hewan coba dengan dosis 20 mg/kg BB dan 10 mg/kg BB dapat menyebabkan hipertensi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol ubi jalar ungu pada hewan coba tikus putih (*Rattus novergicus*) yang diinduksi DOCA-salt. Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus novergicus*) yang dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif yang diinduksi DOCA-salt, kelompok terapi ekstrak etanol ubi jalar ungu dosis 200 mg/kg BB dan kelompok terapi ekstrak etanol ubi jalar ungu dosis 400 mg/kg BB. Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah perubahan ekspresi iNOS dan profil protein dari organ jantung tikus. Ekspresi iNOS dilakukan dengan metode immunohistokimia dan analisa profil protein dilakukan dengan metode elektroforesis SDS-PAGE. Hasil penelitian menunjukkan penurunan kadar iNOS secara signifikan ($p < 0,01$) pasca terapi ekstrak etanol ubi jalar ungu. Penurunan kadar ekspresi iNOS sebesar 87,40 % pada tikus kelompok terapi ekstrak etanol ubi jalar ungu dosis 400 mg/kg BB terhadap kelompok kontrol positif. Hasil analisa profil protein dengan ekstrak etanol ubi jalar ungu dosis 400 mg/kg BB memberikan pengaruh hilangnya protein dengan berat molekul 115 kDa diduga sebagai *C-Reactive Protein* (CRP) yang muncul pada tikus kelompok kontrol positif. Dapat disimpulkan bahwa terapi ekstrak etanol ubi jalar ungu dapat menurunkan kadar ekspresi iNOS dan menghambat sintesis protein 115 kDa dengan dosis terbaik sebesar 400 mg/kg BB.

Kata Kunci : Hipertensi, DOCA-salt, Ekstrak etanol ubi jalar ungu (*Ipomeabatatas*), Ekspresi iNOS, Profil Protein

The Effect of Ethanol Extract of Purple Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L. var. Ayamurasaki) on Protein Profile and Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) on Heart of Rats (*Rattus novergicus*) Model Hypertension

ABSTRACT

Hypertension is one of the cardiovascular disease shown by systolic blood pressure ≥ 140 mmHg and diastolic blood pressure ≥ 90 mmHg. Induction of DOCA-salt in hemoglobin at doses of 20 mg/kg BW and 10 mg/kg BW may lead to hypertension. The aim of this research was to investigate the effect of ethanol extract of purple sweet potato on rats (*Rattus novergicus*) induced by DOCA-salt. The experimental animals used in this study were white rats (*Rattus novergicus*) divided into 4 groups, that is negative control group, positive control group that was injected DOCA-salt, group treated with ethanol extract of purple sweet potato 200 mg/kg BW, and the group treated with ethanol extract of purple sweet potato 400 mg/kg BW. The parameters observed in this study were changes in iNOS expression and protein profiles of rats. INOS expression was showed by immunohistochemical method and protein profile was performed by SDS-PAGE method. The result showed that group treated with ethanol extract of purple sweet potato significantly ($p < 0.01$) decreased iNOS levels. Decrease of iNOS expression level was 87.40% in group treated with ethanol extract of purple sweet potato dose 400 mg/kg BW that compared with positive control group. Result of protein profile analysis of ethanol extract of purple sweet potato, showed loss of protein with molecular weight of 115 kDa suspected as C-Reactive Protein (CRP) which appear on positive control group. It can be concluded that therapy with ethanol extract of purple sweet potato can decrease iNOS levels and inhibit protein synthase of 115 kDa with the best dose of 400 mg/kg BW.

Keywords: Hypertension, DOCA-salt, Ethanol Extract of Purple Sweet Potato (*Ipomoea batatas*), Expression of iNOS, Protein Profile

KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah S.W.T yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul “**Pengaruh Ekstrak Etanol Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas L. var. Ayamurasaki*) Terhadap Profil Protein dan Ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) pada Jantung Tikus Putih (*Rattus novvergicus*) Model Hipertensi**” yang merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Kimia, di Fakultas MIPA Universitas Brawijaya, Malang. Shalawat serta salam semoga senantiasa tercurah kepada Nabi Mummad SAW dan umatnya hingga akhir zaman, amin.

Dalam penyusunan skripsi ini, penulis tidak terlepas dari bimbingan serta dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES dan Dr. Sasangka Prasetyawan, MS selaku dosen pembimbing yang telah banyak meluangkan waktu untuk memberikan masukan dan nasehat selama proses penelitian hingga akhir.
2. Drs. Warsito, Ms selaku dosen penasihat akademik yang senantiasa memberikan masukan, nasehat dan dukungan kepada penulis selama masa studi.
3. Masruri, S.Si., M.Si., Ph.D selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.
4. Bapak Suwardi, Ibu Puji Rahayu, Iin Suwardi, dan Danny Tri Mawardi S.Pd selaku keluarga penulis yang selalu mendoakan, memberikan dukungan baik moriil maupun materiil, nasihat, masukan dan semangat kepada penulis selama masa studi.
5. Bapak Maryono yang telah membantu penulis selama pengerjaan penelitian di Lab. Biokimia
6. Rekan Lab. Biokimia dan rekan tim penelitian Hipertensi, Ibu Irma Sarita Rahmawati, Rasida Rahma, Veronica Marsyaria, S.Si, Tamara Yuniarias Putri, S.Si, Muhammad Iqbal, dan Hilman Nurmahdi, M.Si.
7. Seluruh rekan-rekan kimia angkatan 2014, khususnya Endah Sekar Palupi, Rihma Fathin Fataty dan Yuliatin yang selalu memberikan semangat dan masukan.

Akhir kata, semoga penelitian ini bermanfaat khususnya bagi penulis dan umumnya bagi masyarakat dalam rangka menambah wawasan pengetahuan.

Malang, 16 Juli 2018

Penulis



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK.....	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SINGKATAN DAN SIMBOL.....	xiv

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan Penelitian	3
1.5 Manfaat Penelitian	3

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

1.1 Hipertensi.....	5
1.2 Klasifikasi Hipertensi.....	5
1.3 Faktor-Faktor Penyebab Terjadinya Hipertensi	6
1.3.1 Faktor-Faktor yang Tidak Dapat Dikendalikan.....	6
1.3.2 Faktor-Faktor yang Dapat Dikendalikan	7
1.4 Sistem Renin-Angiotensin-Aldosteron (RAAS)....	7
1.5 Stres Oksidatif pada Hipertensi	9
1.6 Induksi <i>DOCA-salt</i> pada Tikus Model Hipertensi.....	11
1.7 Ubi Jalar Ungu (<i>Ipomoea batatas L. var.</i> <i>Ayamurasaki</i>) Sebagai Sumber Antosianin.....	12
1.8 Ekspresi iNOS (<i>inducible Nitric Oxide</i> <i>Synthase</i>)	14
1.9 SDS PAGE (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> <i>Poly-acrylamide Gel Electrophoresis</i>).....	15
1.10 Hewan Uji Coba Tikus Putih (<i>Rattus</i>	

<i>novergicus</i>).....	16
1.11 Organ Jantung	16

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan Penelitian	19
3.1.1 Alat Penelitian.....	19
3.1.2 Bahan Penelitian	19
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	19
3.3 Tahapan Penelitian	20
3.4 Rancangan Penelitian.....	20
3.5 Persiapan Hewan Coba.....	21
3.6 Persiapan Hewan Coba Tikus (<i>Rattus</i> <i>novergicus</i>) Model Hipertensi Induksi <i>DOCA-salt</i>	21
3.7 Pembuatan Ekstrak Etanol Ubi Jalar Ungu (<i>Ipomoea</i> <i>batatas L. var. Ayamurasaki</i>)	22
3.8 Terapi dengan Ekstrak Etanol Ubi Jalar Ungu (<i>Ipomoea</i> <i>batatas L. var. Ayamurasaki</i>)	22
3.9 Pengukuran Tekanan Darah Tikus dengan Metode <i>Tail Cuff</i>	22
3.10 Pembedahan dan Pengambilan Organ Jantung Tikus	23
3.11 SDS-PAGE (<i>Sodium Deodecyl Sulphate</i> <i>Poly-acrylamide Gel Electrophoresis</i>)	23
3.11.1 Isolasi Protein.....	23
3.11.2 Persiapan Gel	23
3.11.3 Injeksi Sampel dan <i>Running</i>	24
3.11.4 Pewarnaan Gel	24
3.11.5 Penentuan Berat Molekul.....	24
3.12 Pembuatan Preparat	25
3.13 Pengamatan Ekspresi iNOS dengan Uji Immunohistokimia.....	25
3.14 Pengamatan Preparat	26
3.15 Analisa Data	26

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Ekstrak Etanol Ubi Jalar Ungu terhadap Perubahan Ekspresi <i>inducible Nitric Oxide Synthase</i> (iNOS) pada Jantung Tikus Putih (<i>Rattus</i>

<i>novergicus</i>) Hipertensi Model Induksi DOCA-salt.....	27
4.2 Pengaruh Ekstrak Etanol Ubi Jalar Ungu terhadap Profil Protein pada Jantung Tikus Putih (<i>Rattus</i> <i>novergicus</i>) Hipertensi Model Induksi DOCA-salt.....	31

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan	34
5.2 Saran	34

DAFTAR PUSTAKA	35
-----------------------------	-----------



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1: Klasifikasi hipertensi berdasarkan perbedaan tinggi tekanan darah.....	6
Tabel 3.1: Rancangan kelompok penelitian	21
Tabel 4.1: Presentase ekspresi iNOS.....	29
Tabel 4.2: Perbedaan berat molekul protein jantung hasil isolasi organ jantung tikus kontrol negatif, kontrol positif, terapi ubi ungu dosis 200 mg/kg BB dan terapi ubi ungu dosis 400 mg/kg BB	32



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1: Skema sistem renin-angiotensin.....	9
Gambar 2.2: Mekanisme terjadinya stres oksidatif pada penderita hipertensi.....	10
Gambar 2.3: Struktur kimia <i>deoxycorticosterone acetate</i> (DOCA)	11
Gambar 2.4: Struktur umum antosianin	13
Gambar 2.5: Mekanisme reaksi antosianin menetralkan radikal bebas	14
Gambar 2.6: Ekspresi <i>inducible Nitric Oxide Synthase</i> (iNOS) pada Jantung.....	15
Gambar 2.7: Pembagian Ruangan Jantung.....	17
Gambar 4.1: Ekspresi <i>inducible Nitric Oxide Synthase</i> (iNOS) jantung tikus pada perbesaran 400 kali	28
Gambar 4.2: Perbandingan nilai rata-rata ekspresi iNOS....	29
Gambar 4.3: Profil protein jantung tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>) dengan metode SDS-PAGE	31

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran A. Kerangka Konsep Penelitian.....	41
Lampiran B. Diagram Alir	42
Lampiran C. Preparasi Larutan dan Perhitungan	49
Lampiran D. Kurva Standar Marker SDS-PAGE.....	52
Lampiran E. Perhitungan Ekspresi iNOS	53
Lampiran F. Analisa Statistika Ekspresi iNOS Jantung Tikus	56
Lampiran G. Sertifikasi Laik Etik	60



DAFTAR SINGKATAN DAN SIMBOL

Singkatan

ADH	(Antidiuretic Hormone)
ACE	(Angiotensin Converting Enzyme)
ANOVA	(Analysis of Variance)
APS	(Ammonium Persulphate)
ATP	(Adenosin Triphosphate)
BNJ	(Beda Nyata Jujur)
CAT	(Catalase)
CRP	(C-Reactive Protein)
DAB	(Diamino Benzidine)
DOCA	(Deoxycorticosterone Acetate)
eNOS	(Endothelial Nitric Oxide Sythase)
GPx	(Glutathione Peroxidase)
IL-1	(Interleukin-1)
IL-6	(Interleukin-6)
iNOS	(inducible Nitric Oxide Synthase)
LGB	(Lower Gel Buffer)
NADPH	(Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate)
NF-kB	(Nuclear Factor-kappaB)
nNOS	(neuronal Nitric Oxide Sythase)
NO	(Nitric Oxide)
PAI-1	(Plasminogen Activator Inhibitor-1)
PFA	(Paraformaldehyd)
PBS	(Phospat Buffered Saline)
PMSF	(Poly Methyl Sulfonil Fluoride)
RAAS	(Renin Angiotensin Aldosterone System)
RAL	(Rancangan Acak Lengkap)
Rf	(Retardation Factor)
ROS	(Reactive Oxygen Spesies)
RSB	(Reducing Sample Buffer)
SDS-PAGE	(Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
SOD	(Superoxide Dismutase)
TEMED	(Tetramethyl Ethylene Diamine)
TNF-α	(Tumor Necrosis Factor)
UGB	(Upper Gel Buffer)

Simbol

α	Alfa
β	Beta
μL	Mikro liter
mL	Mili liter



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Hipertensi merupakan penyebab kematian utama pada manusia yang berhubungan dengan penyakit kardiovaskular. Sekitar 80% kematian terjadi di negara berkembang. Pada tahun 2012, hipertensi menjadi penyebab kematian penduduk dunia sebesar 9,4 juta dalam satu tahun [8]. Tahun yang sama juga menunjukkan jumlah kematian di Indonesia yang disebabkan oleh *stroke* sebesar 17,7 % dan penyakit jantung iskemia sebesar 10,0 % pada 15 Kabupaten/Kota yang keduanya sangat berkaitan dengan hipertensi [3]. Pasien yang mengalami hipertensi sangat sulit dideteksi karena tidak ada gejala yang ditimbulkan, namun dapat ditunjukkan dengan tekanan darah sistolik ≥ 140 mmHg dan tekanan darah diastolik ≥ 90 mmHg. Sehingga, diperlukan penanganan yang baik agar tidak menimbulkan berbagai penyakit seperti *stroke*, gagal ginjal, serangan jantung dan komplikasi [1].

Secara umum, pengobatan pada penderita hipertensi dibutuhkan dalam jangka waktu yang lama. Pemilihan obat merupakan salah satu faktor keamanan yang harus dipertimbangkan untuk penggunaan obat jangka panjang. Terdapat dua macam jenis obat yang digunakan untuk mengobati hipertensi yaitu obat sintetis dan obat herbal. Obat sintetis merupakan obat yang berasal dari hewan atau tumbuhan yang telah melalui proses kimiawi dan dapat menimbulkan efek samping yang cukup besar. Obat herbal merupakan bahan alam yang dapat digunakan sebagai alternatif lain untuk menggantikan obat sintetis dan memiliki efek samping yang lebih kecil [34].

Salah satu obat herbal yang banyak digunakan adalah ubi jalar ungu. Ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L.*) merupakan jenis umbi berwarna ungu pekat karena adanya kandungan antosianin. Antosianin merupakan pigmen yang sangat penting dan larut dalam air yang berpotensi untuk mencegah berbagai penyakit seperti hipertensi, demam, gangguan hati, diare dan influenza. Pigmen ini banyak terdapat pada makanan seperti sayur dan buah-buahan [6-7]. Kandungan antosianin yang sangat tinggi dalam ubi jalar ungu sebesar 282 mg/100 g berat basah sangat berpotensi menjadi sumber

antioksidan untuk menetralkan radikal bebas melalui mekanisme *scavenging* dengan melepaskan H• pada gugus OH fenolik [23].

Pada penelitian ini digunakan hewan uji coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar jantan. Tikus putih diinduksi menggunakan DOCA-salt yang dapat menyebabkan hipertensi karena terjadi peningkatan aldosteron. Hormon aldosteron akan berikatan dengan reseptor *mineralokortikoid* yang menyebabkan stres oksidatif melalui mekanisme aktivasi NADPH oksidase sehingga produksi ROS meningkat. ROS akan berikatan dengan NO yang menyebabkan produksi NO menurun dan menghasilkan radikal bebas peroksinitrit (ONOO•) yang lebih reaktif. Radikal peroksinitrit (ONOO•) menyebabkan ekspresi *inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) pada sel otot polos meningkat melalui aktivasi NF-kB yang menyebabkan inflamasi dan tekanan darah meningkat. Aktivasi NF-kB juga menyebabkan sintesis sitokin proinflamasi yang menghasilkan berbagai protein penanda inflamasi dan kerusakan pada jaringan. [4-5,27]. Oleh karena itu, diperlukan pengembangan penelitian ubi jalar ungu yang diketahui memiliki fungsi sebagai antiinflamasi, antioksidan dan antihipertensi.

Berdasarkan uraian diatas, maka perlu dilakukan penelitian mengenai pengaruh ekstrak etanol ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L. var. Ayamurasaki*) sebagai terapi hipertensi. Pada penelitian ini, diamati profil protein dan ekspresi iNOS dari organ jantung tikus (*Rattus norvegicus*) hipertensi model induksi DOCA-salt baik sebelum maupun sesudah dilakukan terapi dengan ekstrak etanol ubi jalar ungu. Sehingga, dapat diketahui pengaruh ekstrak etanol ubi jalar ungu sebagai obat hipertensi.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah terdapat perbaikan ekspresi *inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) jantung pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) hipertensi model induksi DOCA-salt pasca terapi ekstrak etanol ubi jalar ungu?
2. Bagaimana perubahan gambaran profil protein jantung pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) hipertensi model induksi DOCA-salt pasca terapi ekstrak etanol ubi jalar ungu?

1.3 Batasan Masalah

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar berjenis kelamin jantan dengan berat badan 170 g. Tikus didapatkan dari laboratorium Biosains Universitas Brawijaya Malang. Penggunaan hewan coba telah menyertakan sertifikat laik etik No: 724-KEP-UB dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya Malang.
2. Dosis DOCA-salt yang digunakan pada tikus (*Rattus norvegicus*) untuk kondisi hipertensi dengan dosis 20 mg/kg BB sebanyak 5 kali injeksi dan 10 mg/kg BB sebanyak 5 kali injeksi berikutnya. Induksi DOCA-salt dilakukan sebanyak 2 kali dalam 1 minggu dan dilakukan selama 5 minggu.
3. Dosis terapi ekstrak etanol ubi jalar ungu yang diberikan pada hewan uji coba model hipertensi sebesar 200 mg/kg BB dan 400 mg/kg BB 1 kali sehari selama 2 minggu. Ekstrak etanol ubi jalar ungu dibuat dengan melarutkannya dalam minyak jagung 1 mL.
4. Hewan coba tikus dikatakan hipertensi apabila tekanan darah sistolik ≥ 140 mmHg dan tekanan darah diastolik ≥ 90 mmHg.
5. Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah profil protein jantung tikus dengan metode elektroforesis SDS-PAGE dan ekspresi *inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) pada organ jantung tikus menggunakan metode immunohistokimia.

1.4 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui perbaikan ekspresi *inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) jantung pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) hipertensi model induksi DOCA-salt pasca terapi ekstrak etanol ubi jalar ungu.
2. Untuk mengetahui perubahan gambaran profil protein jantung pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) hipertensi model induksi DOCA-salt pasca terapi ekstrak etanol ubi jalar ungu.

1.5 Manfaat Penelitian

1. Memberi informasi ekspresi *inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) dan profil protein pada jantung tikus putih (*Rattus*

- norvegicus*) model hipertensi induksi DOCA-salt pasca terapi ekstrak etanol ubi jalar ungu.
2. Memberi informasi terkait dosis ekstrak etanol ubi jalar ungu yang dibutuhkan untuk terapi hipertensi.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Hipertensi

Tekanan darah adalah kemampuan darah untuk menekan pembuluh darah ketika darah di pompa oleh jantung. Tekanan darah terbagi menjadi dua yaitu tekanan darah sistolik dan tekanan darah diastolik. Tekanan darah sistolik merupakan tekanan darah terbesar ketika jantung memompa darah atau keadaan kontraksi. Sedangkan tekanan darah diastolik merupakan berkurangnya tekanan darah atau keadaan dilatasi ketika jantung beristirahat. Hipertensi atau tekanan darah tinggi disebabkan adanya tekanan darah yang berlebihan dan hampir tidak konstan pada arteri. Penyakit hipertensi ditunjukkan dengan tekanan darah sistolik ≥ 140 mmHg dan tekanan darah diastolik ≥ 90 mmHg [1].

Hipertensi termasuk salah satu penyakit kardiovaskular yang merupakan penyebab kematian nomor satu di dunia. Sekitar 80% kematian terjadi di negara berkembang. Pada tahun 2012, dalam setahun terjadi kematian sebesar 9,4 juta akibat hipertensi. Hipertensi berisiko menyebabkan kematian pada penyakit jantung iskemia sekitar 45% dan *stroke* sebesar 51% [8]. Sekitar 1433 (53,9%) perempuan dan 1225 (46,1%) laki-laki di India mengalami hipertensi. Penyebab terjadinya hipertensi adalah obesitas, faktor genetik dan stres. Oleh karena itu, kesadaran masyarakat untuk memperbaiki gaya hidup sangat dibutuhkan untuk mencegah terjadinya hipertensi seperti mencukupi kebutuhan nutrisi, mengurangi makanan berlemak, serta pemeriksaan rutin terutama yang memiliki faktor risiko yang lebih tinggi [2].

2.2 Klasifikasi Hipertensi

Hipertensi dapat dibagi menjadi dua berdasarkan etiologinya yaitu hipertensi primer (esensial) dan hipertensi sekunder. Dapat dibedakan sebagai berikut [1]:

1. Hipertensi primer atau esensial merupakan penyakit hipertensi yang faktor penyebabnya belum diketahui. Faktor yang diduga menjadi penyebab terjadi hipertensi primer antara lain bertambahnya usia, stres psikologis, genetik, dan jenis kelamin.

2. Hipertensi sekunder merupakan penyakit hipertensi yang faktor penyebabnya sudah diketahui yaitu berasal dari penyakit sistemik lain seperti gangguan hormonal, penyakit ginjal, kegemukan, merokok, kurang olahraga, konsumsi minuman beralkohol dan pemakaian obat-obatan. Penderita hipertensi sekunder lebih sedikit dibandingkan dengan hipertensi primer, prevalensinya sekitar 50% dari seluruh penderita hipertensi. Berikut klasifikasi hipertensi berdasarkan tinggi tekanan darah [9]:

Tabel 2.1 Klasifikasi hipertensi berdasarkan perbedaan tinggi tekanan darah [9]

Kategori	Tekanan Darah Sistolik (mmHg)	Tekanan Darah Diastolik (mmHg)
Normal	<120	<80
Prehipertensi	120-139	80-89
Tingkat I (Hipertensi Ringan)	140-159	90-99
Tingkat II (Hipertensi Sedang)	160-179	100-109
Tingkat III (Hipertensi Berat)	≥180	≥110
Hipertensi Sistolik Terisolasi	≥140	<90

2.3 Faktor-Faktor penyebab Terjadinya Hipertensi

Faktor-faktor yang menyebabkan terjadinya hipertensi dapat dibagi menjadi dua yaitu faktor yang dapat dikendalikan dan faktor yang tidak dapat dikendalikan. Dapat dibedakan sebagai berikut :

1.3.1 Faktor-faktor yang tidak dapat dikendalikan

a. Umur

Hipertensi akan meningkat seiring bertambah usia akibat terganggunya pengaturan metabolisme zat kapur atau kalsium yang terbawa bersama aliran darah. Hal ini menyebabkan darah menjadi lebih padat. Endapan kalsium dalam dinding pembuluh darah

menyebabkan penyempitan pembuluh darah (aterosklerosis), sehingga tekanan darah menjadi meningkat. Selain itu, bertambahnya usia menyebabkan elastisitas arteri berkurang dan jantung bekerja lebih kuat untuk memompa darah [11].

b. Genetik

Sekitar 70-80% faktor genetik berhubungan dengan hipertensi esensial karena berkaitan dengan metabolisme pengaturan garam dan renin pada membran sel. Hipertensi lebih banyak ditemukan pada kembar *monozigot* daripada *dizigot*. Adanya mutasi gen menyebabkan aliran darah tidak normal sehingga memicu terjadinya hipertensi [12].

c. Jenis kelamin

Secara umum penderita hipertensi lebih banyak laki-laki dibandingkan dengan perempuan. Tetapi, pada saat perempuan memasuki masa *menopause*, prevalensi hipertensi meningkat. Hal ini disebabkan karena menurunnya produksi hormon estrogen [13].

1.3.2 Faktor-faktor yang dapat dikendalikan

a. Obesitas

Obesitas terjadi karena adanya penimbunan lemak yang berlebihan sehingga, meningkatkan kerja jantung. Risiko terkena penyakit hipertensi akibat obesitas sekitar 2 sampai 6 kali lipat dibandingkan dengan orang yang memiliki berat badan ideal [14].

b. Konsumsi garam

Konsumsi garam yang tinggi berhubungan dengan hipertensi esensial. Pengurangan konsumsi garam dapat menurunkan tekanan darah sistolik sekitar 3 hingga 5 mmHg pada orang tua [13].

2.4 Sistem Renin-Angiotensin-Aldosteron (RAAS)

Sistem renin angiotensin aldosteron adalah suatu sistem yang berperan dalam mengatur tekanan darah, homeostasis sistem kardiovaskular dan keseimbangan cairan serta elektrolit dalam tubuh. Sistem RAAS terjadi ketika adanya penurunan tekanan darah yang mengakibatkan peningkatan sekresi renin pada ginjal [12]. Sekresi renin pada ginjal disebabkan oleh aktivasi saraf simpatis (pengaktifan melalui β_1 -adrenoseptor), penurunan tekanan arteri ginjal (penurunan tekanan sistemik atau stenosis arteri ginjal) dan penurunan asupan garam ke tubulus distal. Renin disekresi oleh sel

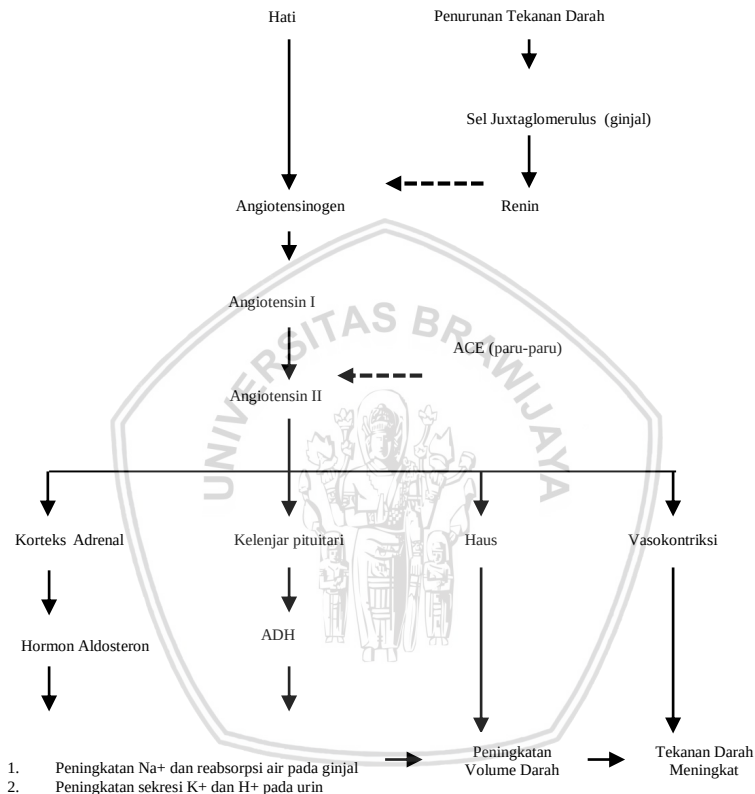
juxtaglomerulus yang terdapat pada dinding arteriol aferen ginjal yang berfungsi untuk meningkatkan tekanan darah. Renin merupakan enzim proteolitik tahap awal atau proses inisiasi pada sistem RAAS. Kemudian, renin akan mengubah angiotensinogen (protein α -globulin) yang disekresi oleh hati menjadi angiotensin I (peptida asam amino-10) secara enzimatik. Renin berada di dalam darah sekitar 30 menit hingga 1 jam untuk membentuk angiotensin I. Angiotensin I bersifat vasokonstriktor yang lemah sehingga tidak cukup untuk melakukan perubahan fungsional dalam fungsi sirkulasi [15–17].

Selanjutnya, angiotensin I akan diubah menjadi angiotensin II (peptida asam amino-8). Perubahan yang terjadi sangat cepat dan hanya beberapa detik selama darah mengalir di pembuluh darah kecil paru-paru yang dikatalisis oleh suatu enzim pengubah yaitu ACE (*Angiotensin Converting Enzyme*) yang terdapat di endotelium pembuluh paru [16]. ACE tidak hanya ditemukan di paru-paru tetapi juga ditemukan disepanjang jaringan epitel pembuluh darah. Angiotensin II bersifat vasokonstriktor yang sangat kuat sehingga mampu melakukan perubahan fungsional dalam fungsi sirkulasi dan mengurangi sekresi renin. Angiotensin II berada di dalam darah sekitar satu atau dua menit yang kemudian akan dinaktivasi secara cepat oleh jaringan dan berbagai enzim darah yang disebut angiotensinase [17].

Vasokonstriksi yang sangat cepat dan lemah dapat mempengaruhi angiotensin II dalam darah. Vasokonstriksi yang sangat cepat untuk meningkatkan tekanan arteri. Vasokonstriksi utama terjadi di arteriol yang dapat meningkatkan tahanan perifer sehingga tekanan arteri meningkat. Vasokonstriksi sedikit lebih lemah pada vena yang dapat meningkatkan aliran balik darah vena ke jantung, sehingga membantu jantung untuk melawan kenaikan tekanan [16].

Pengaruh kedua, angiotensin II dapat menstimulasi sekresi hormon aldosteron pada korteks adrenal yang terletak di atas ginjal. Hormon aldosteron bekerja pada tubula distal nefron yang menyebabkan tubula tersebut mereabsorpsi ion Na^+ dan air yang mengakibatkan terjadi peningkatan volume darah dan tekanan darah. Selain itu, hormon aldosteron dapat meningkatkan sekresi ion K^+ dan H^+ dalam urin. Peningkatan K^+ dalam cairan ekstraseluler juga dapat

menstimulasi sekresi hormon aldosteron [15]. Angiotensin II dapat merangsang sistem saraf pusat untuk menjadi haus sehingga kelenjar di bawah otak (pituitari) mengeluarkan hormon vasopresin (ADH) yang akan meningkatkan reabsorpsi natrium dan air pada ginjal [17].

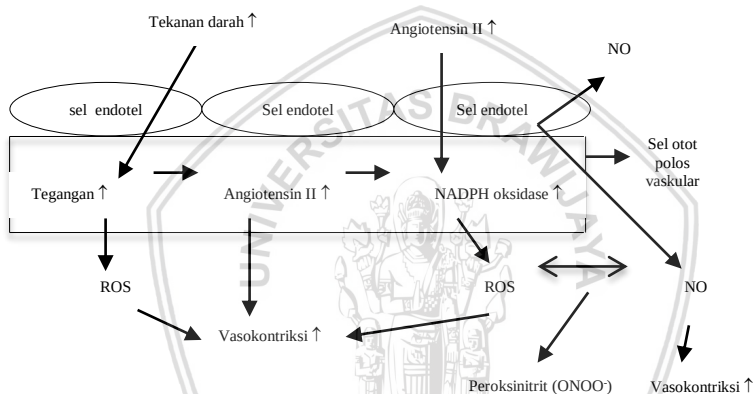


Gambar 2.1 Skema sistem renin-angiotensin [17]

2.5 Stress Oksidatif Pada Hipertensi

Stres oksidatif merupakan suatu kondisi ketidakseimbangan antara radikal bebas yang diproduksi dengan antioksidan endogen dalam tubuh. Penyebab terjadinya stres oksidatif dipicu oleh dua kondisi yaitu jumlah antioksidan yang terlalu sedikit dan jumlah radikal bebas (pro oksidan) yang terlalu banyak [18]. Radikal bebas merupakan atom atau molekul yang memiliki satu atau lebih elektron

tidak berpasangan. Dalam proses biokimia radikal bebas menunjukkan bagian penting dari metabolisme normal sebagai hasil samping dalam jumlah yang sedikit. Keadaan stres oksidatif ditunjukkan dengan terjadinya peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan dalam kondisi normal ROS berperan penting pada proses fisiologis seperti sistem pertahanan, sinyal seluler, fertilisasi dan biosintesis hormon. Tetapi, peningkatan ROS dalam jumlah yang tinggi menyebabkan terjadinya stres oksidatif sehingga, berimplikasi pada berbagai penyakit seperti aterosklerosis, hipertensi, gagal jantung, diabetes dan lain-lain [19, 37].



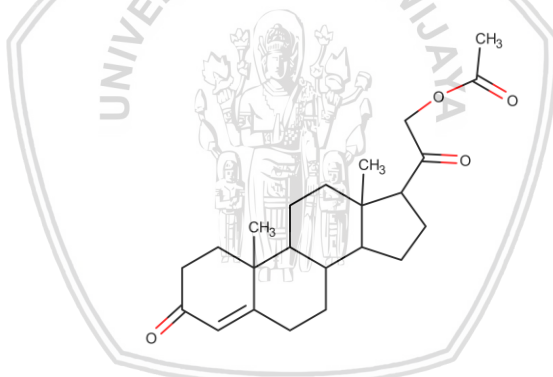
Gambar 2.2 Mekanisme terjadinya stres oksidatif pada penderita hipertensi [35]

Stres oksidatif dapat disebabkan oleh 3 faktor yaitu peningkatan oksidan, penurunan antioksidan dan sel gagal dalam memperbaiki kerusakan oksidatif. Pasien dengan hipertensi esensial memiliki tingkat peroksida lipid yang tinggi, diikuti dengan menurunnya antioksidan endogen dalam tubuh, seperti superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT), dan glutathion peroksidase (GPx). Stimulus utama produksi ROS dalam tubuh pada penderita hipertensi esensial adalah tingginya tegangan pada dinding pembuluh darah menyebabkan aktivasi sistem renin angiotensin aldosteron (RAAS) dengan pembentukan angiotensin II melalui mekanisme aktivasi NADPH oksidase (NOX). Sel endotel merupakan bagian dari

pembuluh darah yang berperan penting dalam homeostasis vaskuler dan terdiri dari monolayer aktif. Nitrat oksida (NO) adalah mediator penting yang disintesis oleh sel endotel sebagai vasodilator, penurun permeabilitas, antiinflamator dan antioksidan. Disfungsi sel endotel berkaitan dengan penurunan ketersediaan NO dalam darah. NO akan berinteraksi dengan ROS sehingga, membentuk peroksinitrit (ONOO^-) yang merupakan radikal kuat dan menyebabkan terjadinya inflamasi dan vasokonstriksi pada pembuluh darah. [18, 20].

2.6 Induksi *DOCA-salt* pada Tikus Model Hipertensi

Deoxycorticosterone adalah hormon steroid golongan mineralokortikoid dihasilkan oleh kelenjar adrenal bagian korteks. Korteks adrenal terletak di atas ginjal dan terdiri dari dua lapis yaitu bagian korteks dan medula. *Mineralokortikoid* yang disintesis oleh korteks adrenal berfungsi untuk mengatur keseimbangan elektrolit dengan cara meningkatkan retensi natrium dan ekskresi kalium [5].



Gambar 2.3 Struktur kimia *deoxycorticosterone acetate* (DOCA)[21]

Deoxycorticosterone Acetate (DOCA)-salt adalah mineralokortikoid sintetik yang menyebabkan hipertensi pada hewan uji tikus. DOCA-salt merupakan model hipertensi sekunder karena adanya pengaruh endokrin (hormon) dan mempunyai kemiripan dengan aldosteron yang dapat menyebabkan stres oksidatif. Induksi DOCA-salt sudah umum digunakan pada hewan coba model hipertensi karena, pemaparan DOCA-salt lebih cepat meningkatkan

tekanan darah dengan kadar renin yang dihasilkan lebih rendah dan jarang terjadi kerusakan organ yang fatal [5].

Mekanisme yang terjadi diawali dengan meningkatnya konsentrasi aldosteron sehingga terjadi reabsorpsi natrium dan air pada ginjal yang disertai sekresi kalium mengakibatkan meningkatnya volume darah sehingga tekanan darah meningkat. Meningkatnya tekanan darah menyebabkan tegangan pada dinding pembuluh darah juga meningkat dan menjadi stimulus utama dalam pembentukan ROS. Aldosteron akan berikatan dengan reseptor *mineralokortikoid*, menyebabkan stres oksidatif melalui mekanisme aktivasi NADPH oksidase (NOX) dan juga berperan dalam pembentukan ROS pada berbagai penyakit kardiovaskular. ROS akan berikatan dengan NO yang dilepaskan oleh sel endotel sehingga ketersediaan NO berkurang melalui proses *uncoupling* eNOS dan akan menghasilkan radikal peroksinitrit (ONOO⁻). Aktivasi NADPH oksidase (NOX) berkontribusi pada disfungsi endotel, apoptosis dan inflamasi [4, 5].

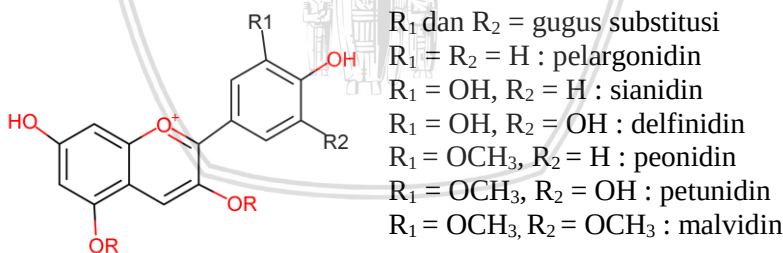
Kelebihan *mineralokortikoid* dapat menyebabkan hipertensi karena hormon aldosteron terikat pada reseptor *mineralokortikoid* dipermukaan sel atau dalam sel yang merupakan golongan *reseptor nuclear ligand dependent* dan memiliki kemampuan untuk meregulasi proses transkripsi suatu gen. Reseptor *mineralokortikoid* ditemukan pada banyak tempat diantaranya, otot polos pembuluh darah, otak dan jaringan fibroblast dalam jantung. Ikatan yang terjadi antara hormon dan reseptor dapat merubah fungsi dari sel. Sehingga, hormon akan mengendalikan volume cairan, kadar air dan garam serta mengendalikan fungsi organ secara keseluruhan. Penanda utama hewan uji coba model hipertensi yang diinduksi oleh DOCA-salt ditandai dengan adanya kenaikan tekanan darah serta hipertrofi pada jantung [4, 22].

2.7 Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas* L. var. *Ayamurasaki*) Sebagai Sumber Antosianin

Ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas* L.) merupakan tanaman yang tumbuh di daerah tropis atau subtropis. Ubi jalar ungu dapat tumbuh dengan baik di Indonesia yang memiliki iklim tropis, baik di daerah pantai maupun pegunungan dan tersebar luas di berbagai pulau di Indonesia seperti Jawa, Sumatera dan Bali. Varietas ubi jalar

ditemukan dalam berbagai warna seperti kuning, oranye dan ungu. Ubi jalar ungu paling banyak diteliti pada saat ini karena memiliki kandungan antosianin yang cukup tinggi sebagai antioksidan dan antiinflamasi. Jepang merupakan salah satu negara yang mempromosikan secara intensif manfaat antosianin dalam ubi jalar ungu. Varietas *Ayamurasaki* yang digunakan pada penelitian ini merupakan varietas ubi jalar ungu berasal dari Jepang dan di tanam komersial di Indonesia khususnya Malang dan Pasuruan dengan hasil 15-20 ton/ha. Ubi jalar ungu varietas *Ayamurasaki* memiliki antioksidan lebih tinggi dibandingkan dengan ubi jalar putih, kuning atau oranye[23].

Pelarut yang dapat digunakan untuk mengeskrak antosianin yaitu pelarut polar seperti etanol, metanol, air, aseton atau campuran dari pelarut tersebut. Metanol paling banyak digunakan dalam industri tetapi memiliki sifat toksik dan berbahaya dibandingkan dengan jenis alkohol lainnya. Etanol adalah pelarut yang digunakan dalam penelitian ini untuk mengekstrak antosianin dari ubi jalar ungu karena etanol merupakan jenis alkohol yang lebih ramah lingkungan dibandingkan dengan metanol. Selain itu, etanol memiliki azeotrop positif yang mendidih pada suhu lebih rendah daripada rasio lain dan konstituennya [40].



R = Jenis glikon atau gula terasilasi

Gambar 2.4. Struktur umum antosianin[26]

Antosianin merupakan senyawa flavonoid yang termasuk kelompok senyawa polifenol. Pigmennya larut dalam air, berperan dalam pemberian warna ungu, biru atau merah yang memiliki jenis flavonoid menguntungkan bagi tubuh sebagai antioksidan,

antiinflamasi dan antihipertensi. Antosianidin adalah aglikon antosianin yang terbentuk apabila antosianin dihidrolisis dengan asam. Kandungan antosianin yang sangat tinggi dalam ubi jalar ungu sebesar 282 mg/100 g berat basah sangat berpotensi menjadi sumber antioksidan untuk menetralkan radikal bebas melalui mekanisme *scavenging* dengan melepaskan $H\bullet$ pada gugus OH fenolik. Selain itu, antosianin tersebut dapat meningkatkan produksi NO yang merupakan vasodilator yang kuat. Apabila terjadi stres oksidatif produksi NO akan menurun dan pemberian antioksidan dapat meningkatkan produksi NO sehingga mencegah terjadinya inflamasi, hipertensi dan penyakit kardiovaskular lainnya [25,39,41].



Gambar 2.5 Mekanisme reaksi antosianin menetralkan radikal bebas

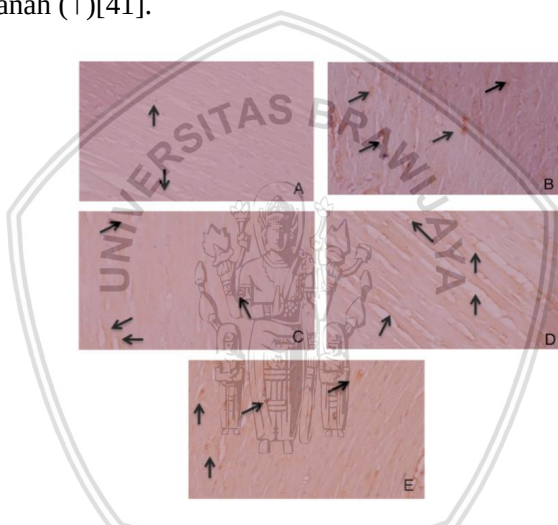
2.8 Ekspresi iNOS (*inducible Nitric Oxide Synthase*)

Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) merupakan salah satu enzim dari tiga isoform NOS yang mensintesis *nitric oxide* (NO) berfungsi sebagai mediator penting pada sistem kardiovaskular. Tiga isoform dari *Nitric oxide synthase* (NOS) yaitu, endothelial NOS (eNOS), inducible NOS (iNOS) dan neuronal NOS (nNOS). L-arginin (prekursor NO) akan dikatalisis oleh eNOS pada sel endotel menjadi NO dalam sistem kardiovaskular normal yang memiliki efek sitoprotektif. Sedangkan pada keadaan sakit, NO dihasilkan seribu kali lipat lebih banyak yang dikatalisis oleh iNOS pada sel otot polos dan memiliki efek sitotoksik bagi tubuh daripada NO yang dihasilkan oleh eNOS. Selain itu, iNOS diekspresikan oleh sel eritrosit, pembuluh darah, imun, paru-paru, ginjal, otot polos dan pankreas [27].

Ekspresi iNOS meningkat disebabkan karena radikal superoksida ($O_2^{\bullet -}$) yang tinggi sehingga mengaktivasi NF- κ B. Radikal superoksida ($O_2^{\bullet -}$) dan NO diproduksi secara bersamaan akan bereaksi membentuk radikal peroksinitrit ($ONOO^{\bullet -}$) yang lebih reaktif dengan toksisitas

yang tinggi. Interaksi yang terjadi antara radikal superoksida (O_2^-) dan NO tiga kali lipat lebih cepat dibandingkan interaksi antara radikal superoksida (O_2^-) dengan antioksidan superoksida dismutase (SOD). Radikal bebas diproduksi di dalam lisosom, mitokondria, membran plasma, retikulum endoplasma dan inti sel [27, 28].

Ekspresi *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) pada jantung tikus kontrol positif menunjukkan hasil yang berbeda dengan tikus kontrol negatif seperti yang ditunjukkan pada **Gambar 2.6**. Ekspresi iNOS diperlihatkan pada area yang berwarna coklat menunjukkan adanya ikatan antara antigen dan antibodi pada jantung dengan menggunakan metode imunohistokimia yang ditunjukkan dengan tanda panah ($\uparrow$) [41].



Gambar 2.6 Ekspresi *inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) pada Jantung [41]

Keterangan : A=tikus kontrol negatif (sehat), B=tikus kontrol positif (hipertensi), C=tikus terapi *captropil*, D=tikus terapi ekstrak peptida bekasang 200 mg/kg BB, E= tikus terapi ekstrak peptida bekasang 400 mg/kg BB. Tanda $\uparrow$ menunjukkan ekspresi iNOS

2.9 SDS PAGE (*Sodium Deodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

SDS PAGE (*Sodium Deodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel*

Electrophoresis) adalah suatu metode yang sudah umum digunakan untuk menganalisa suatu protein berdasarkan berat molekul dan pergerakan protein dalam gel poliakrilamid yang diberi aliran listrik sehingga terbentuk kutub positif dan negatif. Protein merupakan suatu makro molekul tersusun atas monomer-monomer yang disebut asam amino. Setiap protein memiliki muatan listrik dan berat molekul yang berbeda-beda karena, jumlah asam amino penyusun protein yang berbeda-beda. Sehingga, berdasarkan perbedaan tersebut protein dapat dipisahkan, salah satunya dengan metode SDS PAGE (*Sodium Deodecyl Sulpate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) [29, 30].

Teknik elektroforesis menggunakan gel poliakrilamid sebagai medium pemisah, dengan cara protein di denaturasi terlebih dahulu dengan pemanasan dalam larutan sodium dedosil sulfat (SDS). Denaturasi protein menyebabkan terjadinya interaksi hidrofobik antara molekul protein dan molekul SDS sehingga akan memberikan muatan negatif pada protein dalam larutan. Interaksi yang terjadi berhubungan dengan ukuran molekul protein, semakin kecil ukuran molekul protein maka semakin sedikit muatan listrik dan sebaliknya. Kompleks protein yang terdenaturasi SDS dalam gel poliakrilamid akan berjalan searah menuju kutub positif (anoda) dengan teknik elektroforesis. Selain itu, ukuran molekul protein juga menentukan jarak yang ditempuh protein untuk menembus pori-pori gel. Semakin besar molekul maka, semakin dekat jarak yang di tempuh dan sebaliknya. [30]. Hasil SDS-PAGE berupa profil protein yang dibandingkan dengan marker protein sehingga diketahui berat molekulnya dan perbedaan protein yang muncul pada setiap klompok perlakuan. Dengan demikian, metode pemisahan dapat dilakukan berdasarkan berat molekulnya

2.10 Hewan Uji Coba Tikus Putih (*Rattus novergicus*)

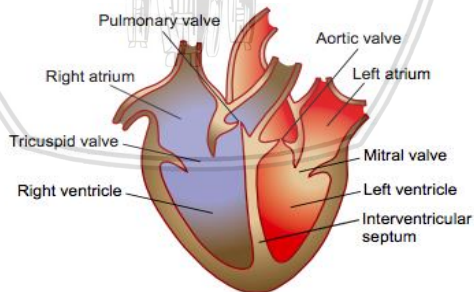
Tikus putih (*Rattus novergicus*) adalah hewan uji coba yang biasa digunakan dalam penelitian karena mudah dipelihara dan relatif sehat. Pada penelitian ini digunakan strain wistar jenis kelamin jantan. Tikus putih jantan memiliki ukuran tubuh yang lebih besar dan ekor yang lebih panjang dibandingkan dengan tikus putih betina. Strain wistar juga memiliki mata berwarna merah dan warna rambut putih [31].

Klasifikasi tikus putih (*Rattus novvergicus*) sebagai berikut [32]:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Myomorpha
Famili	: Muridae
Genus	: Rattus
Spesies	: <i>Rattus novvergicus</i> strain wistar

2.11 Organ Jantung

Jantung adalah organ otot berongga yang memiliki empat ruang dua bagian kanan dan dua bagian kiri. Ruang jantung bagian atas sebagai serambi (atrium) dan ruang jantung bagian bawah sebagai bilik (ventrikel). Secara umum antrium berfungsi menerima darah yang mengalir menuju jantung sedangkan ventrikel berfungsi memompa darah dari jantung. Pada bagian atrium dibagi menjadi dua bagian yaitu atrium kanan dan kiri. Atrium kanan berfungsi menerima darah dari *vena cava inferior* dan *vena kava superior* menuju ventrikel kanan yang akan dipompa menuju paru-paru. Atrium kiri berfungsi menerima darah dari paru-paru menuju ventrikel kiri yang akan dipompa ke seluruh tubuh [32].



Gambar 2.7 Pembagian Ruangan Jantung [33]

Secara mikroskopis sel otot jantung memiliki bentuk yang mirip dengan sel otot tulang dengan bentuk lurik tetapi memiliki percabangan dan saling terhubung dengan sel otot lainnya. Sel otot

jantung memiliki inti pada bagian tengah dan banyak terdapat mitokondria yang berfungsi sebagai penghasil ATP (*Adenosine Triphosphat*) sebagai sumber energi sehingga, sel otot jantung dapat berkontraksi secara terus menerus. Aktin dan myosin adalah penyusun utama otot jantung yang memiliki ukuran ketebalan yang berbeda apabila diamati secara mikroskopis. Myosin memiliki otot lebih tebal dengan warna yang lebih gelap dibandingkan dengan aktin yang memiliki otot lebih tipis dengan warna yang lebih terang dengan pengamatan mikroskopis [33].



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan Penelitian

3.1.1 Alat penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain seperangkat bak pemeliharaan hewan coba, seperangkat alat bedah, seperangkat alat *blood pressure analyzer*, pipet mikro, mortar , blok es, botol semprot, labu takar, gelas kimia, pengaduk, penangas air, lemari pendingin, timbangan digital, alat sentrifugator, sonikator, mikroskop cahaya, seperangkat alat elektroforesis, mikrotub, spuit, jarum sonde, *yellow tip* dan *blue tip*, masker, plastik klip, sarung tangan, aluminium foil, *power supply*, *shaker*, dan vortex.

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain ekstrak etanol ubi jalar ungu, sampel jantung tikus putih (*Rattus novvergicus*), *Deaxycorticosterone Acetat* (DOCA)-salt, minyak jagung, PBS-Tween, T-acryl, *Lower Gel Buffer* (LGB), *Upper Gel Buffer* (UGB), akuades, *Ammonium Persulphate* (APS), *N, N, N', N', -tetramthyl ethilene diamine* (TEMED), larutan *reducing sample buffer* (RSB), protein standar marker, larutan *staining*, larutan *destaining*, larutan *buffer* Tris-HCl, larutan PBS, larutan PFA 4%, larutan NaCl fisiologis 0,9%, hidrogen peroksida, BSA 1%, antibodi primer anti Rat iNOS, antibodi sekunder (*Goat Anti Rat IgG biotin labeled*), kromogen, *DAB* (*diamino benzidine*), pewarna *major hematoxylin*, pasir kuarsa, etanol (70%, 80%, 90%, 95%, 96%), alkohol, xilol I dan xilol II.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) dan Laboratorium Biokimia-Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Waktu penelitian dilakukan pada bulan Januari hingga Juli 2018.

3.3 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap, yaitu :

1. Persiapan hewan uji coba
2. Persiapan hewan coba tikus (*Rattus novergicus*) model hipertensi induksi *deoxycorticosterone acetat* (DOCA)-salt
3. Pembuatan ekstrak etanol ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L. var. Ayamurasaki*)
4. Perlakuan terapi dengan ekstrak etanol ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L. var. Ayamurasaki*)
5. Pengukuran tekanan darah tikus dengan metode *tail cuff*
6. Pembedahan hewan coba dan pengambilan organ jantung tikus
7. Isolasi protein pada organ jantung tikus
8. Persiapan gel elektroforesis SDS-PAGE
9. Injeksi sampel, *running* elektroforesis SDS-PAGE dan proses pewarnaan
10. Penentuan berat molekul
11. Pembuatan Preparat
12. Pengamatan ekspresi iNOS dengan uji immunohistokimia
13. Analisis data

3.4 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan merupakan rancangan acak lengkap (RAL) karena penelitian bersifat homogen. Hewan uji coba dibagi menjadi empat kelompok perlakuan, yaitu kelompok 1 adalah tikus yang tidak diinduksi DOCA-salt dan tidak diterapi dengan ekstrak etanol ubi jalar ungu (kontrol negatif), kelompok 2 adalah tikus yang diinduksi DOCA-salt tetapi tidak diterapi dengan ekstrak etanol ubi jalar ungu (kontrol positif), kelompok 3 adalah tikus yang diinduksi DOCA-salt dan diterapi ekstrak etanol ubi jalar ungu dengan dosis 200 mg/kg BB, kelompok 4 adalah tikus yang diinduksi DOCA-salt dan diterapi ekstrak etanol ubi jalar ungu dengan dosis 400 mg/kg BB. Penentuan jumlah sampel dalam penelitian ini ditentukan berdasarkan rumus :

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

$$(n-1) (5-1) \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$n \geq 4,75 \quad n \pm 5 \text{ tikus}$$

Keterangan :

t= jumlah kelompok uji

n= jumlah ulangan

Berdasarkan perhitungan jumlah ulangan di atas, untuk empat kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan paling sedikit 5 kali dalam setiap kelompok perlakuan. Sehingga, diperlukan 20 hewan uji coba.

Tabel 3.1 Rancangan kelompok penelitian

Variabel yang diamati	Ulangan				
Penurunan ekspresi iNOS dan profil protein jantung	1	2	3	4	5
Kelompok 1 (kontrol negatif)					
Kelompok 2 (kontrol positif)					
Kelompok 3 (terapi 200 mg/kg BB)					
Kelompok 4 (terapi 400 mg/kg BB)					

3.5 Persiapan Hewan Coba

Tikus putih yang digunakan sebagai hewan uji coba dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan. Setiap kelompok perlakuan terdiri dari 5 ekor tikus yang diletakkan pada kandang. Kandang diletakkan pada Laboratorium Biokimia Universitas Brawijaya sehingga, bebas dari kebisingan dan polutan. Pada kandang tikus diberi serbuk kayu sebagai alas, sehingga kandang mudah dibersihkan.

3.6 Persiapan Hewan Coba Tikus (*Rattus novergicus*) Model Hipertensi Induksi *Deoxycorticosterone Acetate (DOCA)-salt*

Tikus putih (*Rattus novergicus*) terlebih dahulu diadaptasikan dengan kondisi kandang dan pakan selama 1 minggu. Induksi DOCA-salt pada tikus putih dilakukan secara injeksi bagian *cervical* yang dilakukan sebanyak 2 kali dalam seminggu dengan dosis pertama 20 mg/kg BB sebanyak 5 kali dan selanjutnya dengan dosis 10 mg/kg BB sebanyak 5 kali.

3.7 Pembuatan Ekstrak Etanol Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas* L. var. *Ayamurasaki*)

Ekstraksi dilakukan dengan maserasi pada ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas* L. var. *Ayamurasaki*) menggunakan etanol 95% (pro analys). Setiap 100 g bahan kering ubi jalar ungu yang diekstraksi dengan etanol 95% (pro analys) dapat menghasilkan 1 mg ekstrak. Pembuatan ekstrak etanol ubi jalar ungu dilakukan di Laboratorium Kimia Politeknik Negeri Malang Determinasi ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas* L. var. *Ayamurasaki*) dari Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi (Balitkabi) Malang-Jawa Timur. Prosedur pembuatan ekstrak etanol ubi jalar ungu ditunjukkan pada **Lampiran C.7**

3.8 Terapi dengan Ekstrak Etanol Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas* L. var. *Ayamurasaki*)

Pemberian dosis ekstrak etanol ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas* L. var. *Ayamurasaki*) yang diberikan pada hewan coba model hipertensi sebesar 200 mg/kg BB dan 400 mg/kg BB. Ekstrak etanol ubi jalar ungu dilarutkan dalam minyak jagung 1 mL. Pemberian ekstrak etanol ubi jalar ungu dilakukan secara sonde lambung 1 kali sehari selama 2 minggu.

3.9 Pengukuran Tekanan Darah Tikus dengan Metode *Tail Cuff*

Metode *tail cuff* digunakan untuk pengukuran tekanan darah tikus dengan menggunakan alat *blood pressure analyzer* di Rumah Sakit Hewan Pendidikan Universitas Brawijaya. Tekanan darah sistolik dan diastolik tikus dapat diketahui dengan menggunakan alat ini dan prinsip yang sama dengan *sphygmomanometer* pada manusia.

Alat *blood pressure analyzer* terdiri dari dua bagian utama yaitu, *amplifier* untuk mengukur denyut tekanan darah yang diamati pada ekor tikus dan *set recorder* untuk memproses data yang diperoleh. Data yang diperoleh berupa *print out* gambaran gelombang tekanan darah dan nilai tekanan darah secara digital. Prosedur pengukuran tekanan darah melalui metode *tail cuff* antara lain, hewan uji coba tikus dimasukkan dalam holder dan ditenangkan. Manset pengukur tekanan darah dipasang pada bagian ekor. Kemudian pengukuran tekanan darah dilakukan ketika tikus berada dalam posisi tenang.

3.10 Pembedahan dan Pengambilan Organ Jantung Tikus

Pembedahan organ jantung tikus diambil setelah dilakukan terapi ekstrak ubi jalar ungu selama 2 minggu. Tikus diletakkan terlentang di atas papan rebah dorsal, lalu dilakukan dislokasi leher. Kemudian dilakukan nekropsi pada rongga abdomen. Organ jantung yang telah diambil dicuci dengan larutan NaCl fisiologis 0,9% dan dibagi menjadi dua bagian. Satu bagian disimpan dalam larutan PBS untuk mengetahui gambaran profil protein jantung tikus dan satu bagian yang lain, disimpan dalam larutan PFA 4% untuk pengamat ekspresi iNOS uji immunohistokimia.

3.11 SDS-PAGE (*Sodium Deodecyl Sulphate Poly-acrilamide Gel*)

3.11.1 Isolasi Protein

Tahap-tahap yang dilakukan adalah menimbang organ jantung sebanyak 0,3 gram, ditambah sedikit pasir kuarsa dan digerus dengan mortar dingin yang diletakkan di atas blok es. Setelah homogen, ditambah larutan PBS-Tween : PMSF (9:1) sebanyak 1,5 mL dan dipindahkan dalam mikrotub steril. Kemudian, disonikasi selama 10 menit dan disentrifugasi pada suhu 25°C selama 15 menit dengan kecepatan 6000 rpm. Sehingga, diperoleh supernatan dan pellet. Supernatan dipisahkan dan ditambah etanol absolut dingin (1:1). Kemudian didiamkan selama 24 jam dan disimpan dalam *freezer*. Selanjutnya, disentrifugasi pada suhu 4°C selama 15 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Sehingga, diperoleh supernatan dan endapan. Diambil bagian endapan dan dikering anginkan hingga bau etanol hilang. Kemudian, endapan ditambah dengan larutan buffer Tris-HCl 6,8.

3.11.2 Persiapan Gel

Dua plat kaca dirangkai dengan jarak antar plat kurang lebih 1 mm. Gel dibuat dua lapis yaitu *stacking gel* sebagai tempat sampel dan *separating gel* sebagai media pemisahan protein. Pertama, di buat larutan *separating gel* yang terdiri dari *Lower Gel Buffer* (LGB), T-Acryl, akuades, *Ammonium Persulphate* (APS) dan *N, N, N', N', -tetramethyl ethylene diamine* (TEMED) yang dilarutkan menjadi satu dalam akuades steril. Kemudian *separating gel* dituangkan dalam plat gel yang telah disusun dengan menggunakan pipet mikro dan didiamkan hingga gel memadat. Lalu, larutan *stacking gel*

dituangkan di atas *separating gel* yang telah memadat sambil dipasang sisir untuk membentuk sumuran. Pembuatan larutan *stacking gel* terdiri dari *Upper Buffer* (UGB), T-Acryl, *Ammonium Persulphate* (APS), akuades dan *N, N, N', N', -tetramethyl ethylene diamine* (TEMED) yang dilarutkan menjadi satu dalam akuades steril. Setelah terbentuk gel sisir di angkat dan plat di pasang pada alat elektroforesis. Kemudian, dituangkan larutan *running buffer* ke dalam bejana elektroforesis.

3.11.3 Injeksi Sampel dan *Running*

Buffer tris HCl sebanyak 15 μL ditambahkan pada sampel jantung yang telah diisolasi dan dimasukkan dalam tabung mikro. Kemudian, ditambahkan RSB sebanyak 15 μL (perbandingan 1:1) dan dipanaskan dalam penangas air pada suhu 100 $^{\circ}\text{C}$ selama 5 menit. Setelah dingin, dimasukkan dalam sumur-sumur gel yang telah siap dengan volume 30 μL tiap sumuran dan salah satu sumuran gel diisi dengan protein marker sebagai standar. Anoda dihubungkan pada *reservoir* bawah, katoda dihubungkan pada *reservoir* atas dan dihubungkan dengan *power supply* dengan arus listrik konstan dan tegangan sebesar 200 volt. Proses *running* dihentikan hingga warna penanda biru pada jarak kurang lebih 0,5 cm dari batas bawah plat gel.

3.11.4 Pewarnaan Gel

Setelah proses *running* selesai gel direndam dalam larutan *staining* kurang lebih 30-60 menit sambil dilakukan pengocokan dengan *shaker* untuk pewarnaan. Kemudian, warna dihilangkan dengan merendam gel pada larutan *destaining* dan dilakukan pengocokan dengan *shaker* hingga gel jernih.

3.11.5 Penentuan Berat Molekul

Penentuan berat molekul didapatkan dari hasil elektroforesis sampel dan dibandingkan dengan *marker* protein. Kemudian dihitung nilai R_f dari masing-masing pita sehingga dapat menentukan berat molekul protein dengan persamaan :

$$R_f = \frac{\text{Jarak pergerakan protein dari tempat awal (cm)}}{\text{Jarak pergerakan warna dari tempat awal (cm)}}$$

Selanjutnya, dibuat kurva standar hubungan antara harga Rf sebagai sumbu x dan harga logaritma berat molekul sebagai sumbu y. Mobilitas dan berat molekul diplotkan dari protein yang akan dicari sehingga diketahui berat molekul protein.

3.12 Pembuatan Preparat

Tahap-tahap yang dilakukan adalah fiksasi organ jantung dengan perendaman organ dalam larutan PFA 4% minimal selama 7 jam. Kemudian organ di potong dengan ketebalan 2-3 mm, dimasukkan dalam kaset dan di beri kode sesuai perlakuan. Organ diproses dengan alat *Automatic Tissue Tex Processor* selama 90 menit. Selanjutnya, organ dimasukkan dalam etanol (70%, 80%, 90 %, 95%, absolut), xilol I dan xilol II secara berurutan. Organ dimasukkan dalam parafin cair dan dibentuk blok menggunakan *paraffin block*. Didinginkan pada suhu 4°C. Dilakukan pemotongan seukuran 5 µm menggunakan *microtome* dan didinginkan pada suhu ruang. Hasil pemotongan organ direndam dalam *waterbath* pada suhu 38-40°C dan diletakkan pada *object glass*. Kemudian, dikeringkan pada suhu 38-40°C dan preparat jantung siap digunakan untuk pengamatan iNOS dengan uji imunohistokimia.

3.13 Pengamatan Ekspresi iNOS dengan Uji Imunohistokimia

Pada pengamatan ekspresi iNOS dengan uji imunohistokimia, digunakan preparat jantung tikus tanpa pewarnaan. Pertama, dilakukan deparafinisasi dalam xilol (I, II, III), alkohol (absolut, 80%, 70%) dan akuades secara berurutan masing-masing selama 8 menit. Kemudian dimasukkan preparat dalam lemari pendingin ±3 hari. Preparat dicuci menggunakan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali selama 3 menit dan ditetesi hidrogen peroksida (H₂O₂) selama 40 menit. Kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali selama 3 menit. Preparat ditetesi dengan antibodi primer (*anti-rat iNOS*) sebanyak 30 µL pada jaringan. Preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali selama 3 menit dan ditetesi antibodi sekunder berlabel biotin (*Rabbit anti rat biotin labeled*) sebanyak satu tetes tiap jaringan. Selanjutnya, Preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali selama 3 menit dan dicuci dengan akuades sebanyak 3 kali selama 3 menit. Kemudian,

ditetesi DAB pada suhu ruang dan didiamkan selama 15 menit. Jaringan dicuci dengan akuades sebanyak 3 kali selama 3 menit. Selanjutnya, ditetesi *emphy mixing bottle* sebanyak 2 tetes selama 3 menit dan dicuci dengan akuades pH 8 sebanyak 2 kali selama 3 menit. Jaringan di inkubasi semalaman dalam oven. Preparat ditetesi entelan dalam lemari asam serta ditutup *coverglass*. Preparat siap diamati.

3.14 Pengamatan Preparat

Ekspresi iNOS dalam jaringan ditunjukkan pada area yang berwarna coklat dan terdapat di sekitar sel otot polos yang menunjukkan adanya reaksi inflamasi. Pengukuran presentase area ekspresi iNOS pada jantung dilakukan menggunakan *software Axio Vision* dengan cara membandingkan distribusi iNOS pada sediaan histologi kontrol dengan perlakuan pada perbesaran 400 kali. Kemudian dibandingkan perhitungan per luas 5 bidang pandang yang diambil secara acak untuk setiap kelompok perlakuan.

3.15 Analisa Data

Analisis data profil protein ditentukan dengan menghitung berat molekul dengan cara membandingkan hasil elektroforesis sampel dengan *marker* protein, sehingga dapat diketahui jenis protein dalam ekstrak kasar enzim tersebut. Sedangkan untuk iNOS dengan menggunakan analisis kuantitatif statistik. Rancangan percobaan yang akan digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan perlakuan dosis terapi ekstrak etanol ubi jalar ungu adalah 200 mg/kg BB , 400 mg/kg BB dan kontrol. Perubahan yang diamati adalah penurunan kadar iNOS yang terdapat dalam jaringan jantung tikus (*Rattus norvegicus*) model hipertensi yang diinduksi DOCA-salt. Kemudian, dilakukan analisis kuantitatif dengan menggunakan Analisis Ragam *One Way ANOVA*. Apabila ada perbedaan yang nyata dilakukan uji lanjutan Beda Nyata Jujur ($\alpha=0,05$). Analisis uji statistik dilakukan dengan menggunakan software SPSS 15.0.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

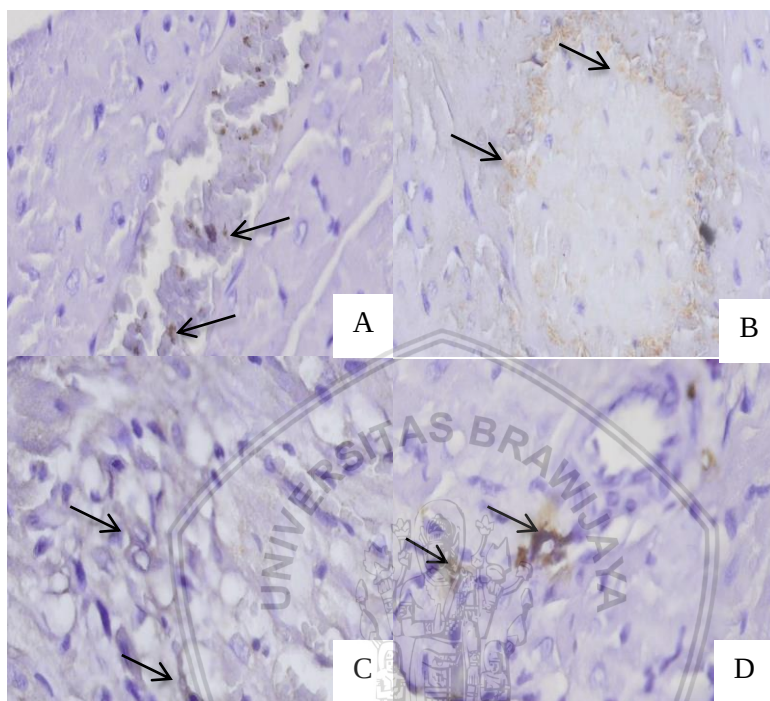
4.1 Pengaruh Ekstrak Etanol Ubi Jalar Ungu Terhadap Perubahan Ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) pada Jantung Tikus Putih (*Rattus novergicus*) Hipertensi Model Induksi DOCA-salt

Ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) pada jantung terdapat pada sel otot polos dan bersifat sitotoksik dalam jumlah yang besar. Terjadi peningkatan ekspresi iNOS disebabkan produksi ROS tinggi yang akan berikatan dengan *Nitric Oxide* (NO) menyebabkan NF- κ B teraktivasi dan selanjutnya mentranskripsikan gen iNOS. Sehingga produksi NO meningkat seribu kali lipat yang dikatalisis oleh iNOS sebagai penyebab terjadinya inflamasi [27]. **Gambar 4.1** memperlihatkan gambaran ekspresi iNOS dengan pembentukan warna coklat pada jantung di bawah pengamatan mikroskop. Berdasarkan uji immunohistokimia dapat disimpulkan bahwa terjadi pembentukan ekspresi iNOS pada kelompok perlakuan. Intensitas warna yang dihasilkan meningkat tajam pada kelompok kontrol positif yang merupakan tikus hasil induksi DOCA-salt. Kemudian mengalami penurunan setelah diterapi ekstrak ubi jalar ungu.

Ekspresi iNOS diperlihatkan pada area yang berwarna coklat menunjukkan adanya ikatan antara antigen dan antibodi pada jantung. Pada preparat terdapat iNOS yang berperan sebagai antigen akan berikatan dengan antibodi primer (*anti rat iNOS*) yang dilabeli dengan antibodi sekunder (*Rabbit anti rat biotin labeled*). Kemudian penambahan DAB akan memberikan warna coklat terhadap antigen yang berikatan dengan antibodi primer yang dilabeli antibodi sekunder [36].

Pengukuran jumlah presentase ekspresi iNOS secara immunohistokimia dilakukan dengan menggunakan *software axio vision*. Mekanisme kerjanya berdasarkan pada titik-titik berwarna coklat yang terdapat pada preparat. Pengukuran dilakukan pada perbesaran 400 kali yang dilakukan sebanyak 5 kali pada setiap kelompok perlakuan. Pengukuran ekspresi iNOS diperoleh dalam satuan presentase area. Hasil yang didapatkan diuji signifikansinya

menggunakan *one way* ANOVA dengan taraf signifikansi $<0,05$.



Gambar 4.1 Ekspresi *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) jantung tikus pada perbesaran 400 kali

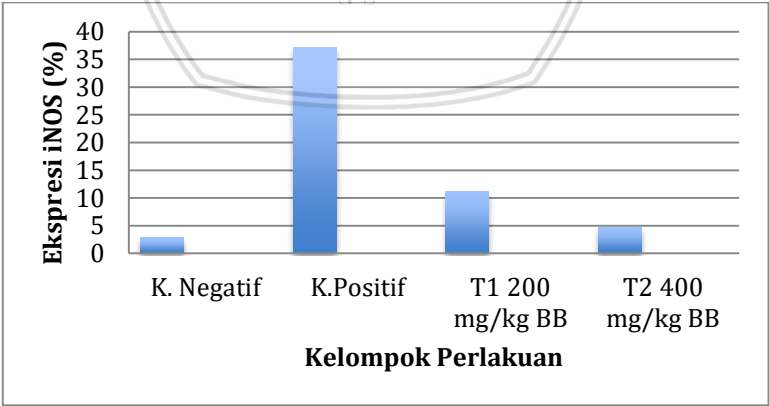
Keterangan : A=Ekspresi iNOS jantung kelompok kontrol negatif, B=Ekspresi iNOS jantung kelompok kontrol positif, C=Ekspresi iNOS jantung kelompok terapi ekstrak etanol ubi ungu 200 mg/kg BB, D=Ekspresi iNOS jantung kelompok terapi ekstrak etanol ubi ungu 400 mg/kg BB (→) merupakan tanda penunjuk lokasi adanya antigen dalam jaringan.

Tabel 4.1 Presentase jumlah ekspresi iNOS

Kelompok Perlakuan	Rata-rata iNOS (Mean $\pm$ SD (%area)	Peningkatan iNOS terhadap kontrol negatif (%)	Penurunan iNOS terhadap Kontrol positif (%)
KN	2,86 $\pm$ 0,11 ^a	-	-
KP	37,14 $\pm$ 0,16 ^d	1198, 60	-
T1	11,18 $\pm$ 0,13 ^c	-	69, 90
T2	4,68 $\pm$ 0,37 ^b	-	87, 40

Keterangan : Angka *superscript* (notasi) berbeda menunjukkan perbedaan antar perlakuan dengan uji BNJ (Beda Nyata Jujur) 5%

KN = Ekspresi iNOS jantung kelompok kontrol negatif
KP = Ekspresi iNOS jantung kelompok kontrol positif
T1 = Ekspresi iNOS jantung kelompok terapi ekstrak etanol ubi ungu 200 mg/kgBB
T2 = Ekspresi iNOS jantung kelompok terapi ekstrak etanol ubi ungu 400 mg/kgBB



Gambar 4.2 Perbandingan nilai rata-rata ekspresi iNOS

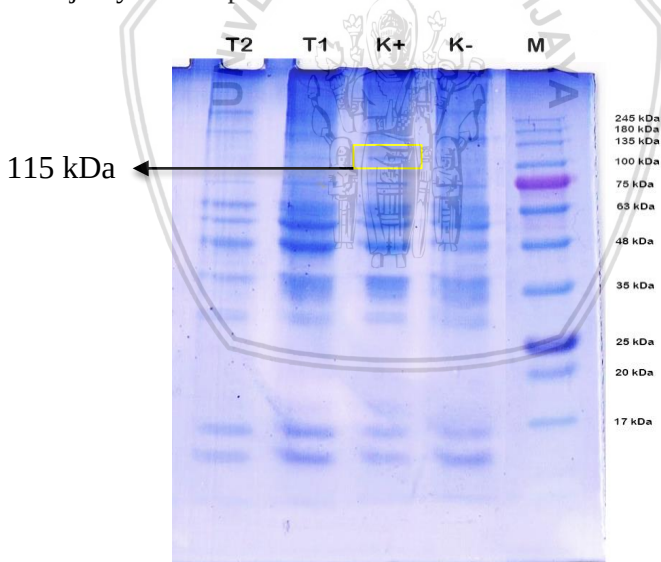
Kelompok perlakuan kontrol negatif menunjukkan nilai rata-rata ekspresi iNOS sebesar $2,86 \pm 0,11$. Nilai rata-rata kelompok kontrol negatif merupakan standar yang digunakan untuk mengetahui adanya peningkatan maupun penurunan ekspresi iNOS yang terjadi pada kelompok kontrol positif hasil induksi DOCA-salt, kelompok terapi ekstrak etanol ubi jalar ungu dosis 200 mg/kg BB dan kelompok terapi ekstrak etanol ubi jalar ungu dosis 400 mg/kg BB. Pada kelompok kontrol negatif terdapat ekspresi iNOS yang menggambarkan pembentukan NO dalam jumlah yang kecil. Dari data yang diperoleh menunjukkan bahwa pembentukan iNOS merupakan proses alami sel yang terjadi pada jantung. NO hasil aktivasi iNOS berperan dalam relaksasi otot polos pembuluh darah serta otot jantung. iNOS diekspresikan oleh sel imun, eritrosit, otot polos, pembuluh darah, ginjal, pankreas dan paru-paru [27].

Ekspresi iNOS terjadi pada semua kelompok perlakuan tetapi dalam jumlah yang berbeda. Pada kelompok kontrol positif yang diinduksi DOCA-salt menunjukkan ekspresi iNOS paling banyak dengan nilai rata-rata sebesar $37,14 \pm 0,16$ dan peningkatan ekspresi iNOS terhadap kontrol negatif sebesar 1198,60%. Adanya peningkatan ini membuktikan bahwa radikal bebas yang terbentuk akibat peningkatan tekanan darah dapat meningkatkan ekspresi iNOS pada jantung tikus model hipertensi. Kemudian pada kelompok terapi ekstrak etanol ubi jalar ungu dosis 200 mg/kg BB menunjukkan nilai rata-rata sebesar $11,18 \pm 0,13$ dan terjadi penurunan ekspresi iNOS terhadap kontrol negatif sebesar 69,90%. Sedangkan pada kelompok terapi ekstrak etanol ubi jalar ungu dosis 400 mg/kg BB menunjukkan nilai rata-rata sebesar $4,68 \pm 0,37$ dan juga terjadi penurunan ekspresi iNOS terhadap kontrol negatif sebesar 87,40%. Berdasarkan data di atas menunjukkan bahwa terapi ekstrak etanol ubi jalar ungu dosis 200 mg/kg BB dan 400 mg/kg BB menunjukkan penurunan kadar ekspresi iNOS akan tetapi lebih efektif pada terapi ekstrak etanol ubi jalar ungu dosis 400 mg/kg BB karena penurunan ekspresi iNOS mendekati kelompok kontrol negatif. **Gambar 4.2** memperlihatkan grafik penurunan ekspresi iNOS pada kelompok percobaan pasca terapi ekstrak etanol ubi jalar ungu. Hal ini dapat disebabkan karena adanya antosianin dalam ubi jalar ungu sebagai antioksidan. Kemampuan sebagai antioksidan alami pada antosianin dapat menetralkan radikal bebas melalui mekanisme *scavenging* dengan

melepaskan H• pada gugus OH fenolik [39]. Hal ini menyebabkan molekul NF-κB tidak banyak teraktivasi sehingga ekspresi iNOS, inflamasi dan kerusakan jaringan dapat menurun. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa, pemberian ekstrak etanol ubi jalar ungu mampu menurunkan ekspresi iNOS pada jantung tikus hipertensi model induksi DOCA-salt.

4.2 Pengaruh Ekstrak Etanol Ubi Jalar Ungu terhadap Profil Protein pada Jantung Tikus Putih (*Rattus novergicus*) Hipertensi Model Induksi DOCA-salt

Analisa profil protein dengan metode SDS-PAGE pada tikus kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif yang diinduksi DOCA-salt, kelompok terapi ekstrak etanol ubi jalar ungu dosis 200 mg/kg BB dan kelompok terapi ekstrak etanol ubi jalar ungu dosis 400 mg/kg BB menunjukkan adanya perbedaan profil pita protein (**Gambar 4.3**) pada jantung tikus (*Rattus novergicus*) yang selanjutnya diinterpretasikan dalam **Tabel 4.2**.



Gambar 4.3 Profil protein jantung tikus putih (*Rattus novergicus*) dengan metode SDS-PAGE

Keterangan :

M = Marker protein

K- = Kontrol negatif

K+ = Kontrol positif

T₁ = Terapi ekstrak etanol ubi ungu 200 mg/kg BB

T₂ = Terapi ekstrak etanol ubi ungu 400 mg/kg BB

Tabel 4.2 Perbedaan berat molekul protein jantung hasil isolasi organ jantung tikus kontrol negatif, kontrol positif, terapi ubi ungu dosis 200 mg/kg BB dan terapi ubi ungu dosis 400 mg/kg BB

Kelompok	Berat Molekul Protein (kDa)										
	234	170	136	115	90	75	65	54	40	30	11
K (-)	√	√	√	-	√	√	√	√	√	√	√
K (+)	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
T ₁	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
T ₂	√	√	√	-	√	√	√	√	√	√	√

Berdasarkan hasil analisa profil protein dengan metode SDS-PAGE pada **Gambar 4.3** dan **Tabel 4.2** menunjukkan protein dengan berat molekul 115 kDa diduga merupakan *C-Reactive Protein* (CRP). Molekul CRP terdiri dari 5-6 unit polipeptida non glikosilat yang identik dan setiap unit mempunyai berat molekul 23 kDa terdiri dari 206 residu asam amino yang berikatan satu sama lain secara non-kovalen membentuk satu molekul berbentuk cakram. CRP merupakan protein yang muncul sebagai penanda inflamasi terhadap peningkatan resiko penyakit kardiovaskular. CRP memfasilitasi pelepasan *endothelin-1*, PAI-1 dan meningkatkan jumlah reseptor angiotensin II tipe-1 sehingga produksi ROS meningkat melalui mekanisme aktivasi NADPH oksidase. CRP merupakan salah satu protein sebagai reaksi fase akut dalam respon terhadap infeksi, inflamasi dan kerusakan jaringan yang dihasilkan oleh sel hepatosit [38].

Protein dengan berat molekul 115 kDa yang diduga sebagai CRP tersebut terjadi akibat induksi DOCA-salt yang terjadi pada kelompok kontrol positif. Induksi DOCA-salt menyebabkan peningkatan konsentrasi aldosteron dalam tubuh yang akan berikatan

dengan reseptor *mineralokortikoid* melalui aktivasi NADPH oksidase (NOX) yang memiliki peranan besar dalam pembentukan ROS. Meningkatnya produksi ROS menyebabkan antioksidan enzimatik endogen tidak dapat menyeimbangkan radikal bebas dalam jumlah berlebih sehingga radikal bebas dapat merusak jaringan jantung [4]. Produksi ROS yang tinggi menyebabkan stres oksidatif dan inflamasi pada organ jantung yang akan mengaktivasi NF- κ B sehingga protein CRP meningkat dibawah pengaruh rangsangan sitokin pro-inflamasi (IL-6, IL-1 dan TNF- α). Oleh karena itu, munculnya protein CRP sebagai reaksi fase akut karena terjadinya inflamasi, infeksi dan kerusakan jaringan pada jantung [38].

Pada kelompok terapi 2 dosis 400 mg/kg BB profil pita protein dengan berat molekul 115 kDa tidak disintesis karena kandungan antosianin dalam ekstrak etanol ubi jalar ungu sebagai antioksidan. Antioksidan dibagi menjadi dua kelompok yaitu antioksidan enzimatik yang terdapat dalam tubuh dan antioksidan non enzimatik yang berasal dari luar tubuh seperti flavonoid [39]. Adanya antosianin dalam ekstrak etanol ubi jalar ungu dapat menghambat radikal bebas sehingga dapat mencegah terjadinya stres oksidatif dan mampu memperbaiki inflamasi. Tetapi pada kelompok terapi 1 dosis 200 mg/kg BB profil pita protein menunjukkan tersintesisnya protein dengan berat molekul 115 kDa. Hal ini disebabkan karena dosis 200 mg/kg BB tidak optimum dalam memperbaiki reaksi inflamasi dan stres oksidatif.

Mekanisme kerja antosianin dengan cara menetralkan radikal bebas melalui mekanisme *scavenging* dengan cara melepaskan H• pada gugus OH fenolik sehingga dapat menurunkan produksi ROS. [39]. Menurunnya produksi ROS menyebabkan molekul NF- κ B tidak banyak teraktivasi dan protein CRP sebagai reaksi fase akut akibat inflamasi dan kerusakan jaringan juga berkurang. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa, pemberian ekstrak etanol ubi jalar ungu mampu memberikan pengaruh hilangnya protein dengan berat molekul 115 kDa diduga sebagai CRP yang muncul pada tikus kontrol positif pada jantung tikus hipertensi model induksi DOCA-salt.

BAB V PENUTUP

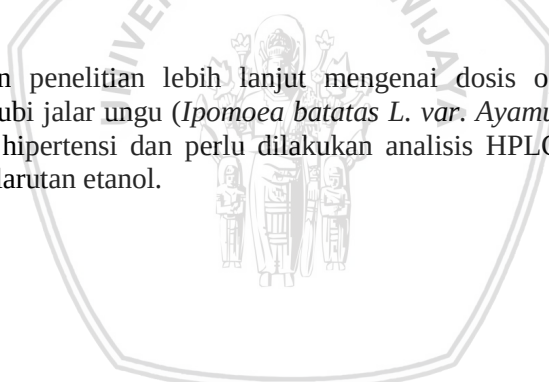
5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Terapi ekstrak etanol ubi jalar ungu dosis 400 mg/kg BB dapat menurunkan kadar ekspresi *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) dengan mengurangi keadaan stres oksidatif sehingga aktivasi molekul NF- κ B (*nuclear factor kappa-B*) sebagai penyebab terjadinya inflamasi juga berkurang.
2. Terapi ekstrak etanol ubi jalar ungu dosis 400 mg/kg BB dapat memberikan pengaruh hilangnya protein dengan berat molekul ± 115 kDa yang diduga sebagai protein *C-Reactive Protein* (CRP) sebagai reaksi fase akut akibat inflamasi dan kerusakan jaringan.

5.2 Saran

Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai dosis optimum ekstrak etanol ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas* L. var. *Ayamurasaki*) sebagai terapi hipertensi dan perlu dilakukan analisis HPLC untuk mengetahui kelarutan etanol.



DAFTAR PUSTAKA

- [1] Kaplan, N. M., Victor, R. G., & Flynn, J. T., 2015, **Kaplan's Clinical Hypertension**, Edisi 11.
- [2] Rao, K. V. M., & Reddy, G. P. K., 2016, **Prevalence of Prehypertension in Young Adults in A Semi-urban District in Telangana**, *International Journal of Advances in Medicine*, 3(1), 63–67.
- [3] Budijanto, Didik, 2015, **Hipertensi The Silent Killer Kemenkes**, www.pusdatin.kemkes.go.id.
- [4] Iyer, A., Chan, V., & Brown, L., 2010, **The DOCA-Salt Hypertensive Rat As A Model of Cardiovascular Oxidative And Inflammatory Stress**, *Current cardiology reviews*, 6(4), 291–297.
- [5] Sjafoer, N. A. A., & Permatasari, N., 2011, **Mekanisme Deoxycorticosterone Acetate (Doca)-Garam Terhadap Peningkatan Tekanan Darah Pada Hewan Coba**, *El-hayah*, 1(4), 199-213.
- [6] Montilla, E. C., Hillebrand, S., & Winterhalter, P., 2011, **Anthocyanins in Purple Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L.) Varieties**, *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, 5(2), 19–23.
- [7] Teow, C. C., Truong, V.-D., McFeeters, R. F., Thompson, R. L., Pecota, K. V., & Yencho, G. C., 2007, **Antioxidant Activities, Phenolic and B-Carotene Contents of Sweet Potato Genotypes With Varying Flesh Colours**. *Food Chemistry*, 103(3), 829–838.

- [8] IFPMA, 2016, **Hypertension: Putting The Pressure on The Silent Killer**, Swiss.
- [9] Kennedy, L., 2009, **Problem Solving in Hypertension**, Clinical Publishing, England.
- [10] Sianturi, E., 2004, **Strategi Pencegahan Hipertensi Esensial Melalui Pendekatan Faktor Resiko di Rumah Sakit Umum Dr.Pirngadi Kota Medan**, Universitas Sumatera Utara, Medan.
- [11] Kamath, S. A., 2008, **Young Hypertensive: How and How Much to Investigate?**, *Medicine Update*, 18, 570–77.
- [12] Oparil, S., Zaman, M. A., & Calhoun, D. A., 2003, **Pathogenesis of hypertension**, *Annals of internal medicine*, 139(9), 761–776.
- [13] Saing, J. H., 2016, **Hipertensi Pada Remaja**, *Sari Pediatri*, 6(4), 159–65.
- [14] Lilyasari, O., 2007, **Hipertensi dengan Obesitas: Adakah Peran Endotelin-1**, *Jurnal Kardiologi Indonesia*, 28(6), 460–475.
- [15] Muñoz-Durango, N., Fuentes, C., Castillo, A., González-Gómez, L., Vecchiola, A., Fardella, C., & Kalergis, A., 2016, **Role of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System Beyond Blood Pressure Regulation: Molecular and Cellular Mechanisms Involved in End-Organ Damage During Arterial Hypertension**. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12), 797.

- [16] Atlas, S. A., 2007, **The Renin-Angiotensin Aldosterone System: Pathophysiological Role and Pharmacologic Inhibition**, *Journal of managed care pharmacy*, 139(9), 9–20.
- [17] Montani, J.-P., & Vliet, B. N. V., 2004, **General Physiology and Pathophysiology of the Renin–Angiotensin System**, Switzerland.
- [18] Subandrate, Faisal, M. E., & Anggraini, N. W., 2017, **Peranan Stres Oksidatif pada Preeklampsia**, 44(5), 353–355.
- [19] Bhattacharya, S., 2015, **Reactive Oxygen Species and Cellular Defense System**, *Free Radicals in Human Health and Disease*, 17–29, Springer India, New Delhi.
- [20] Wu, J., & Harrison, D. G., 2014, **Blood Pressure and Arterial Wall Mechanics in Cardiovascular Disease**, 175–191, Springer London, London.
- [21] Vinson, G. P., 2011, **The Mislabelling of Deoxycorticosterone: Making Sense of Corticosteroid Structure and Function**, *Journal of Endocrinology*, 211(1), 3–16.
- [22] Herman, H., & Putra, B., 2015, **Uji Antihipertensi Infus Kombinasi Biji dan Rambut Jagung (Zea Mays L.) pada Tikus Jantan (Rattus norvegicus) dengan Metode Tail Cuff Non Invasive**, *Media Farmasi*, 12(1), 93–103.
- [23] Ginting, E., Utomo, J. S., Yulifianti, R., & Jusuf, M., 2015, **Potensi Ubijalar Ungu Sebagai Pangan Fungsional**, *Iptek Tanaman Pangan*, 6(1).

- [24] Restiyan, N. L., 2017, **Pengaruh Pemberian Ekstrak n-heksan Akar Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) terhadap Penurunan Kadar Glukosa, Aktivitas Enzim Protease dan Profil Protein pada Hepar Tikus Putih (*Rattus novergicus*) Diabetes Melitus Tipe 1 Pasca Induksi MLD-STZ**, *Skripsi*, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.
- [25] Jawi, I. M., & Yasa, I. W. S., 2012, **Water Extract of Purple Sweet Potato Tubers Reduces Blood Pressure of Hypertensive Rats Induced By NaCl**, *Jurnal Ilmiah Kedokteran*, 43(2), 72-76.
- [26] Castañeda-Ovando, A., Sedo, O., Havel, J., Pacheco, L., Galán-Vidal, C. A., & Contreras López, E., 2012, **Identification of Anthocyanins in Red Grape, Plum and Capulin by MALDI-ToF MS**. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 56(4), 378–383.
- [27] Hong, H.-J., Loh, S.-H., & Yen, M.-H., 2000, **Suppression of The Development of Hypertension By The Inhibitor of Inducible Nitric Oxide Synthase**, 131(3), 631–637.
- [28] Matuskova, Z., Parohova, J., Vrankova, S., Cebova, M., Barta, A., Rehakova, R., Špajdel, M., 2013, **Different Brain and Cardiac NF-Kappab/Nitric Oxide Pathway In Hypertensive and Obese Rats**, *Act Nerv Super Rediviva*, 55(3), 89–94.
- [29] Hames, B. D., 1998, **Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach (3rd Ed.)**, University Press, Oxford, New York.

- [30] Walker, J. M., 2002, **The Protein Protocols Handbook**, Edisi 2, Humana Press.
- [31] Badyal, D. K., Lata, H., & Dadhich, A., 2003, **Animal Models of Hypertension and Effect of Drugs**, *Indian Journal of Pharmacology*, 35, 349–362.
- [32] Faiz, O., & Moffat, D., 2004, **At a Glance Anatomi**. Erlangga, Jakarta.
- [33] Shah, S., Gnanasegaran, G., Sundberg-Cohon, J., & Buscombe, J. R., 2009, **The Heart: Anatomy, Physiology and Exercise Physiology**, *Integrating Cardiology for Nuclear Medicine Physicians*, 3–22, Heidelberg: Springer, Berlin.
- [34] Junaedi, E., Yulianti, S., & Rinata, M. G., 2013, **Hipertensi Kandas Berkat Herbal**, FMedia (Imprint AgroMedia Pustaka), Jakarta.
- [35] Hirata, Y., & Satonaka, H., 2001, **Hypertension and Oxidative Stress**, *Journal of the Japan Medical Association*, 124(11), 1575-1579.
- [36] Kabiraj, A., Gupta, J., Khaitan, T., & Bhattacharya P., 2015, **Principle and Techniques of Immunohistochemistry- A Review**, *International Journal of Biological & Medical Research*, 6(3), 5204-5210.
- [37] Fatriyawan, A.Z., Mahdi, C., Aulanni'am, A., & Wuragil, D.K., 2016, **The Ethanolic Extracts Therapy of Ceremai Leaves (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels) on Malondialdehyde (MDA) Levels and Histopathology of Hepar of Hypercholesterolemic Rats**, *International Journal of Chem Tech Research*, 9(4), 509-512.

- [38] Savoia, C., & Schiffrin, E., 2006, **Inflammation in Hypertension**, Clinical Research Institute of Montreal, University of Montreal, Montreal, Canada.
- [39] Banjarnahor, S., & Artanti, N., 2014, **Antioxidant Properties of Flavonoids**, 23(4), 239-244.
- [40] Sayuti, Kesuma, & Yenrina, Rina, 2015, **Antioksidan, Alami dan Sintetik**, Andalas University Press, Padang.
- [41] Nurmahdi, Hilman, 2016, **Potensi Ekstrak Peptida Bioaktif Bakasang Ikan Cakalang Sebagai Anti Hipertensi Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) Serum Darah, Ekspresi Inducible Nitric Oxide Synthase (Inos) Dan Pengamatan Histopatologi Organ Jantung Pada Tikus Model Hipertensi Hasil Induksi Deoxycorticosterone Acetate (DOCA)-Salt**, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.