

**EFEK PEMBERIAN EKSTRAK UMBI UBIJALAR UNGU (*Ipomoea batatas L.*) DAN VITAMIN C TERHADAP PROLIFERASI *ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS* PADA DARAH TEPI PENDERITA PENYAKIT JANTUNG KORONER STABIL**



**Karya Akhir Untuk Mendapatkan Keterangan Keahlian  
di Bidang Ilmu Penyakit Jantung dan Pembuluh Darah**

**Peneliti :**

**Luh Oliva Saraswati Suastika**

**NIM 011081312**

**Pembimbing :**

**Dr. dr. Yudi Her Oktaviono, Sp.JP(K), FIHA**

**Prof. Dr. dr. Djoko Soemantri, Sp.JP(K), FIHA**

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS-1  
DEPARTEMEN ILMU PENYAKIT JANTUNG DAN PEMBULUH DARAH  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
RSUD Dr. SOETOMO SURABAYA**

**2016**

**EFEK PEMBERIAN EKSTRAK UMBI UBIJALAR UNGU (*Ipomoea batatas L.*) DAN VITAMIN C TERHADAP PROLIFERASI *ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS* PADA DARAH TEPI PENDERITA PENYAKIT JANTUNG KORONER STABIL**

**KARYA AKHIR**

**Untuk Mendapatkan Keterangan Keahlian (Sp.JP) pada  
Program Pendidikan Dokter Spesialis-1  
Ilmu Penyakit Jantung dan Pembuluh Darah  
Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga**

**Oleh:**

**Luh Oliva Saraswati Suastika**

**NIM 011081312**

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS-1  
DEPARTEMEN ILMU PENYAKIT JANTUNG DAN PEMBULUH DARAH  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
RSUD Dr. SOETOMO SURABAYA**

**2016**

**LEMBAR PENGESAHAN**

**EFEK PEMBERIAN EKSTRAK UMBI UBIJALAR UNGU (*Ipomoea batatas L.*) DAN VITAMIN C TERHADAP PROLIFERASI *ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS* PADA DARAH TEPI PENDERITA PENYAKIT JANTUNG KORONER STABIL**

Luh Oliva Saraswati Suastika

NIM. 011081312

Karya akhir ini telah disetujui dan diajukan pada tanggal 9 Agustus 2016

Oleh :

**Pembimbing**

Dr. dr. Yudi Her Oktaviono, Sp.JP(K), FIHA

Prof. Dr. dr. Djoko Soemantri, Sp.JP(K), FIHA

**Koordinator Pendidikan**

dr. Andrianto, Sp.JP(K), FIHA

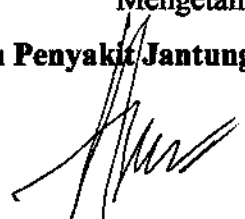
**Koordinator Penelitian**

Prof. Dr. dr. Djoko Soemantri, Sp.JP(K), FIHA

Dr. dr. J. Nugroho Eko Putranto, Sp.JP(K), FIHA

Mengetahui,

**Ketua Departemen Ilmu Penyakit Jantung dan Pembuluh Darah FK UNAIR**

  
dr. M. Aminuddin, Sp.JP(K), FIHA, FAsCC  
NIP. 19540626 198011 1 044

Saya yang bertanda tangan di bawah ini menyatakan bahwa karya akhir ini adalah hasil karya saya sendiri dan di dalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Surabaya, 9 Agustus 2016

Yang Membuat Pernyataan,



Luh Oliva Saraswati Suastika

NIM. 011081312

## PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademik Universitas Airlangga Surabaya, saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : dr. Luh Oliva Saraswati Suastika

NIM : 011081312

Program Studi : Ilmu Penyakit Jantung dan Pembuluh Darah

Departemen : Ilmu Penyakit Jantung dan Pembuluh Darah

Fakultas : Kedokteran Universitas Airlangga

Jenis : Karya Akhir

demikian demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Airlangga Surabaya Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non – Exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

“Efek Pemberian Ekstrak Umbi Ubijalar Ungu (*Ipomoea batatas L.*) dan Vitamin C Terhadap Proliferasi *Endothelial Progenitor Cells* pada Darah Tepi Penderita Penyakit Jantung Koroner Stabil”

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan hak bebas royalti non eksklusif ini, Universitas Airlangga Surabaya berhak menyimpan, mengalih media/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik hak cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Surabaya

Pada Tanggal : 9 Agustus 2016

Yang Menyatakan,



(dr. Luh Oliva Saraswati Suastika)

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan YME atas berkat, rahmat dan anugerah-Nya sehingga karya akhir dengan judul “Efek Pemberian Ekstrak Umbi Ubijalar Ungu (*Ipomoea batatas l.*) dan Vitamin C Terhadap Proliferasi *Endothelial Progenitor Cells* pada Darah Tepi Penderita Penyakit Jantung Koroner Stabil” telah terselesaikan dengan baik.

Penulis menyadari bahwa karya akhir ini tidak dapat terselesaikan dengan baik tanpa bantuan, bimbingan dan dorongan dari berbagai pihak. Kepada DR. dr. Yudi Her Oktaviono, Sp.JP(K), FIHA, dan Prof. DR. dr. Djoko Soemantri, Sp.JP(K), FIHA selaku pembimbing karya akhir kami, pembimbing metodologi penelitian dan statistik serta sebagai koordinator penelitian, penulis ucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya atas segala bimbingan, dukungan dan semangat yang telah diberikan untuk menyelesaikan penelitian ini. Pada kesempatan ini penulis juga menghaturkan terima kasih kepada yang terhormat:

1. Prof. Dr. H. Fasich, Apt., selaku Rektor Universitas Airlangga saat penulis memulai pendidikan, Prof. Dr. Mohammad Nasih, SE, Mt., Ak.,CMA selaku Rektor Universitas Airlangga saat ini, Prof. Dr. dr. Agung Pranoto, M.Sc., Sp.PD, K-EMD, FINASIM selaku Dekan FK Unair saat penulis memulai pendidikan, Prof. Dr. dr. Soetojo, Sp.U selaku Dekan FK Unair saat ini, dr. H. Dodo Anondo, MPH selaku direktur RSUD Dr. Soetomo saat penulis memulai pendidikan dan dr. H. Harsono, selaku Plt. Direktur RSUD Dr. Soetomo saat ini, atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan untuk menempuh PPDS-1 Ilmu Penyakit Jantung dan Pembuluh Darah FK Universitas Airlangga.
2. dr. Muhammad Aminuddin, Sp.JP(K),FIHA,FAsCC selaku Ketua Departemen Ilmu Penyakit Jantung dan Pembuluh Darah FK Universitas Airlangga, atas kesempatan untuk menempuh pendidikan, bimbingan serta bantuannya selama pendidikan.
3. dr. Andrianto, Sp.JP(K), FIHA, selaku Ketua Program Studi Ilmu Penyakit Jantung dan Pembuluh Darah FK Universitas Airlangga atas kesempatan menempuh pendidikan, dan bimbingan serta bantuannya selama pendidikan.

4. dr. Agus Subagjo, Sp.JP(K), FIHA, FAsCC selaku Ketua Program Studi Ilmu Penyakit Jantung dan Pembuluh Darah FK Universitas Airlangga saat penulis memulai pendidikan atas kesempatan menempuh pendidikan, dan bimbingan serta bantuannya selama pendidikan.
5. Prof. Dr. dr. Djoko Soemantri, Sp.JP(K), FIHA, FAsCC, dan Dr. dr. J. Nugroho, Sp.JP(K), FIHA, selaku koordinator penelitian pada Program Studi Ilmu Penyakit Jantung dan Pembuluh Darah FK Universitas Airlangga atas segala bimbingan dan bantuannya selama pendidikan.
6. Prof. Dr. dr. Budi Susetyo Juwono (Alm), Sp.JP(K), FIHA, dan dr. Jatno Karjono (alm), Sp.JP(K), FIHA, atas bimbingan, bantuan dan keteladanan yang diberikan selama masa hidup beliau selama pendidikan.
7. Seluruh Staf Pengajar Program Studi Ilmu Penyakit Jantung dan Pembuluh Darah FK Unair : Prof. dr. R. Moh. Yogiarto, Sp.JP(K), FIHA, FAsCC, Prof. Dr. dr. Budi S. Pikir, Sp.JP(K), Prof. Dr. dr. Rochmad Romdoni, Sp.JP(K), dr. Jeffrey D. Adipranoto, Sp.JP(K), dr. RP. Soeharsohadi, Sp.JP(K), FIHA, dr. Iswanto Pratanu, Sp.JP(K), dr. Dyah Priyatini, Sp.JP(K), dr. Esti Hindariati, Sp.JP(K), dr. Budi Baktijasa, Sp.JP(K), dr. I Gde Rurus Suryawan, Sp.JP(K), dr. Bambang Herwanto, Sp.JP(K), dr. Achmad Lefi, Sp.JP(K), DR. dr. Yudi Her Oktaviono, Sp.JP(K), dr. Moh. Budiarto, Sp.JP, dr. M. Yusuf, Sp.JP, dr. Meity Ardiana, Sp.JP, dr. Rerdin Julario, Sp.JP, dr. Rosi Amrilla F, Sp.JP, dan dr. Nia Dyah Rahmianti, Sp.JP atas segala bimbingan, bantuan dan semangat yang diberikan selama pendidikan.
8. Kepala Bagian/SMF Ilmu Penyakit Dalam, Paru, Radiologi, Rehabilitas Medik, dan Ilmu Kesehatan Anak beserta staf pengajar atas kesempatan belajar serta bimbingannya selama pendidikan.
9. Kepala Ruangan Rawat Inap, Poliklinik Jantung, ICCU, IDIK, IRD dan Ekokardiografi beserta seluruh staf paramedis RSUD Dr. Soetomo Surabaya dan karyawan bagian Ilmu Penyakit Jantung dan Pembuluh Darah FK Universitas Airlangga atas segala bimbingan, kerjasama, motivasi dan bantuannya selama pendidikan.
10. Seluruh pasien yang telah dirawat maupun responden penelitian atas ketulusan dan kerjasamanya, sekaligus menjadi guru bagi penulis selama pendidikan.

11. Rekan – rekan seangkatan : dr. Aldhi Pradana. Sp.JP, dr. Agung Hadi Susanto, Sp.JP, dr. Susetyo Atmojo, dr. Mia Puspitasari, dr. Ahmad Faizal Amir, dan dr. Isnaini atas kerjasama, dukungan, motivasi dan semangat selama pendidikan.
12. Rekan seperjuangan dalam ujian tulis nasional (CBT Maret 2016): dr. Irma Kartikasari, dr. Rina Mawarti, dr. Amelia Arindanie, dr. Susetyo Atmojo, dr. Faizal Amir dan dr. Feranti Meuthia atas segala bantuan, dukungan dan kerjasamanya.
13. Rekan–rekan PPDS–1 Ilmu Penyakit Jantung dan Pembuluh Darah FK Universitas Airlangga atas segala kerjasama, bantuan, semangat selama pendidikan.
14. Kedua orang tua penulis, Prof. DR. dr. Ketut Suastika, Sp.PD-KEMD dan DR. dr. R.A. Tuty Kuswardhani, Sp.PD-KGer, MARS, serta adik penulis, dr. Arresta Vitasatria Suastika, dengan penuh kasih sayang dan perhatian mendoakan dan memberikan dukungan, motivasi dan bantuan selama menempuh pendidikan.
15. dr. I.G.N. Putra Gunadhi, Sp.JP(K), FIHA, FAsCC selaku Kepala Departemen dan Prof. DR. dr. I Wayan Wita, SP.JP(K), FIHA, FAsCC, selaku Ketua Program Studi Ilmu Penyakit Jantung dan Pembuluh Darah FK Universitas Udayana beserta seluruh staf, atas ijin, dukungan dan semangat selama penulis menempuh pendidikan.
16. Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu–persatu, yang turut membantu dan mendukung penulis selama menjalani pendidikan.

Penulis menyadari bahwa karya akhir ini masih banyak kekurangan, oleh karena itu diharapkan sumbang saran dan kritik dari semua pihak demi perbaikan di masa mendatang. Penulis berharap karya akhir ini dapat bermanfaat bagi masyarakat dan bagi perkembangan ilmu pengetahuan. Tidak lupa penulis memohon maaf yang sebesar–besarnya kepada semua pihak atas segala kekurangan dan kesalahan yang dilakukan selama menjalani pendidikan.

Surabaya, 9 Agustus 2016

Penulis



## ABSTRAK

**Efek Pemberian Ekstrak Umbi Ubijalar Ungu (*Ipomoea batatas L.*) dan Vitamin C Terhadap Proliferasi *Endothelial Progenitor Cells* pada Darah Tepi Penderita Penyakit Jantung Koroner Stabil**

Luh Oliva Saraswati Suastika

Yudi Her Oktaviono

Djoko Soemantri

**Latar Belakang** : Jumlah *endothelial progenitor cells* (EPC) terbukti menurun pada pasien penyakit jantung koroner (PJK) stabil, salah satunya dapat disebabkan oleh stres oksidatif. Pemberian antioksidan diduga dapat memperbaiki proliferasi EPC dan meningkatkan jumlah EPC.

**Tujuan** : Untuk mengetahui efek pemberian ekstrak umbi ubijalar ungu (*Ipomoea batatas L.*) dan vitamin C terhadap proliferasi EPC pada darah tepi penderita PJK stabil.

**Metode** : Sel mononuklear dari darah tepi diisolasi dan dikultur pada *fibronectin-coated plates* dengan medium *colony-forming unit* (CFU)-Hill selama tiga hari. Sel yang tidak melekat dibagi menjadi kelompok tanpa perlakuan (kontrol), kelompok eksperimen ekstrak umbi ubijalar (1, 5, 25 µg/ml) dan vitamin C (10, 50, 250 µg/ml); kemudian diinkubasi selama dua hari. Proliferasi EPC dinilai dengan MTT *Cell Proliferation Assay* sesuai protokol standar. Identifikasi EPC menggunakan ekspresi CD34. CFU yang terbentuk dihitung dengan bantuan *inverted light microscope*.

**Hasil** : Ekstrak umbi ubijalar ungu dan vitamin C dosis rendah, sedang dan tinggi meningkatkan proliferasi EPC secara bermakna dibanding kontrol (setiap kelompok vs. kontrol,  $p < 0,001$ ). Tidak terdapat perbedaan proliferasi EPC antara ekstrak umbi ubijalar ungu dosis sedang dan dosis tinggi ( $p = 0,289$ ). Tidak didapatkan perbedaan peningkatan proliferasi EPC antara kelompok ekstrak umbi ubijalar ungu dan vitamin C dosis rendah ( $p = 0,353$ ), sedangkan pada dosis sedang dan tinggi, vitamin C menunjukkan peningkatan proliferasi yang lebih baik dibanding ekstrak umbi ubijalar ungu ( $p = 0,042$  dan  $p < 0,01$ ). Jumlah CFU, menggambarkan kemampuan diferensiasi EPC, didapatkan tertinggi pada kelompok ekstrak umbi ubijalar ungu dibanding vitamin C dan kontrol.

**Kesimpulan** : Ekstrak umbi ubijalar ungu dan vitamin C meningkatkan proliferasi EPC secara *dose-dependent*. Vitamin C merupakan *inducer* proliferasi yang lebih baik dibanding ekstrak umbi ubijalar ungu. Ekstrak umbi ubijalar ungu diduga memicu diferensiasi EPC lebih baik dibanding vitamin C.

**Kata kunci** : proliferasi EPC, ekstrak umbi ubijalar ungu, vitamin C, stres oksidatif.

**ABSTRACT****The Effect of Purple Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L.) Extract and Vitamin C on the Proliferation of Endothelial Progenitor Cells from Peripheral Blood of Stable Coronary Artery Disease Patients**

Luh Oliva Saraswati Suastika

Yudi Her Oktaviono

Djoko Soemantri

**Background :** The number of endothelial progenitor cells (EPCs) are reduced in stable coronary artery disease (CAD) patients, partly caused by oxidative stress. Decreasing oxidative stress with antioxidants may improve EPC proliferation, resulting to increased number of EPC.

**Objective :** To investigate the effect of purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) extract and vitamin C on the proliferation of EPC derived from peripheral blood of stable CAD patients.

**Materials and Methods :** Mononuclear cells were isolated and cultivated on fibronectin-coated plates with colony-forming unit (CFU)-Hill medium for three days. Non adherent cells were divided into untreated (control), purple sweet potato extract (1, 5, 25 µg/ml), and vitamin C (10, 50, 250 µg/ml) groups; then cultured for two days. EPC proliferation was assessed with MTT Cell Proliferation Assay Kit according to kit insert. EPCs were identified by assessing the expression of CD34. Resulted CFU-Hill colonies were documented and counted under an inverted light microscope.

**Results :** EPC proliferation was increased in low, moderate and high doses of purple sweet potato extract and vitamin C compared to control (all groups vs. control,  $p < 0.001$ ). High dose of purple sweet potato extract increased EPC proliferation insignificantly compared to moderate dose ( $p = 0.289$ ). Vitamin C increased EPC proliferation better than purple sweet potato extract in moderate and high dose groups ( $p = 0.042$  and  $p < 0.01$  respectively). Meanwhile, low dose of both treatments increased the EPC proliferation equally ( $p = 0.353$ ). The CFU numbers, representing EPC differentiation capability, were highest in purple sweet potato extract groups compared to control and vitamin C groups.

**Summary :** Purple sweet potato extract and vitamin C increased EPC proliferation dose-dependently. Vitamin C induces EPC proliferation better than purple sweet potato extract. Furthermore, purple sweet potato extract is presumably a better EPC differentiation inducer.

**Keywords:** EPC proliferation, purple sweet potato extract, vitamin C, oxidative stress.

## DAFTAR ISI

SAMPUL DEPAN	
SAMPUL DALAM.....	i
LEMBAR PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
PERNYATAAN PERSETUJUAN.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
ABSTRAK.....	viii
ABSTRACT.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
DAFTAR SINGKATAN.....	xvii
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	6
<b>BAB 2 TINJAUAN KEPUSTAKAAN</b>	
2.1 <i>Endothelial Progenitor Cell</i> (EPC).....	7
2.1.1 Karakteristik dan Identifikasi EPC.....	7
2.1.2 Proliferasi EPC.....	10
2.1.3 Peran EPC dalam Regenerasi Endotel dan Neovaskularisasi .....	12
2.1.4. Dampak Faktor Risiko PJK terhadap EPC.....	15
2.2 Stres Oksidatif dan Antioksidan pada Penyakit Kardiovaskuler....	19
2.2.1 Stres Oksidatif pada Sistem Kardiovaskuler.....	19
2.2.2 Peran Antioksidan pada PJK.....	23
2.3 Ubijalar Ungu.....	26

2.3.1	Struktur Kimia dan Bioavailabilitas Antosianin dari Ubijalar Ungu.....	27
2.3.2	Efek Farmakologis Antosianin.....	29
2.3.3	Efek Antosianin terhadap Sel Endotel dan EPC.....	32
2.4	Vitamin C.....	34
2.4.1	Struktur Kimia dan Bioavailabilitas Vitamin C .....	34
2.4.2	Peran Vitamin C sebagai Antioksidan pada Sistem Kardiovaskuler.....	36
2.4.3	Efek Vitamin C terhadap Fungsi Sel Endotel.....	39
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b>		
3.1	Kerangka Konseptual.....	41
3.3	Hipotesis Penelitian .....	42
<b>BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN</b>		
4.1	Rancangan Penelitian.....	43
4.2	Tempat dan Waktu Penelitian.....	44
4.3	Sampel Penelitian.....	44
4.3.1	Kriteria Inklusi dan Eksklusi.....	44
4.3.2	Penghitungan Besar Sampel.....	45
4.4	Variabel Penelitian.....	46
4.4.1	Variabel Bebas.....	46
4.4.2	Variabel Tergantung.....	46
4.5	Definisi Operasional.....	47
4.6	Bahan dan Alat Penelitian.....	48
4.7	Prosedur Penelitian.....	49
4.7.1	Koleksi Sampel.....	49
4.7.2	Isolasi Sel Darah Tepi dan Kultur EPC.....	49
4.7.3	Pemeriksaan untuk Menilai Proliferasi EPC.....	51
4.7.4	Pemeriksaan untuk Menghitung Jumlah CFU EPC.....	52
4.7.5	Imunofluoresensi.....	52
4.8	Alur Penelitian.....	53
4.9	Pengumpulan, Pengolahan dan Analisis Data .....	53
4.9.1	Pengumpulan Data .....	53

4.9.2 Analisis Data .....	53
4.10 Kelaikan Etik .....	54
<b>BAB 5 HASIL PENELITIAN</b>	
5.1 Karakteristik Dasar Subyek Penelitian.....	55
5.2 Perbandingan Rerata Proliferasi EPC Kelompok Eksperimen Ekstrak Umbi Ubijalar Ungu Dosis Rendah, Sedang dan Tinggi dengan Kontrol.....	56
5.3 Perbandingan Rerata Proliferasi EPC Kelompok Eksperimen Vitamin C Dosis Rendah, Sedang dan Tinggi dengan Kontrol.....	57
5.4 Perbandingan Rerata Proliferasi EPC antara Kelompok Eksperimen Ekstrak Umbi Ubijalar Ungu dengan Vitamin C Dosis Rendah, Sedang dan Tinggi.....	58
5.5 Perbandingan Jumlah CFU EPC Kelompok Eksperimen Ekstrak Umbi Ubijalar Ungu, Vitamin C, dan Kontrol.....	59
5.6 Ekspresi Penanda EPC.....	61
<b>BAB 6 PEMBAHASAN</b>	
6.1 Proliferasi EPC pada Pemberian Ekstrak Umbi Ubijalar Ungu .....	63
6.2 Proliferasi EPC pada Pemberian Vitamin C.....	65
6.3 Perbedaan Peningkatan Proliferasi EPC dan Jumlah CFU antara Pemberian Ekstrak Umbi Ubijalar Ungu dan Vitamin C.....	67
6.4 Ekspresi Penanda Sel.....	69
<b>BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>70</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>72</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>84</b>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Skema kaskade putatif dan profil diferensiasi EPC yang berasal dari sumsum tulang (Asahara dan Kawamoto, 2004).....	8
Gambar 2.2	Morfologi <i>early</i> EPC dan <i>late</i> EPC (Tagawa <i>et al.</i> , 2015).....	9
Gambar 2.3	Mekanisme <i>homing</i> dan diferensiasi EPC (Urbich dan Dimmeler, 2004).....	14
Gambar 2.4	Faktor inflamasi dan oksidatif yang mempengaruhi jumlah dan fungsi EPC (Tousolis <i>et al.</i> , 2008).....	18
Gambar 2.5	Efek ROS terhadap endotel pembuluh darah (Sindler <i>et al.</i> , 2013).....	20
Gambar 2.6	Keterlibatan stres oksidatif, inflamasi dan antioksidan pada level vaskuler (Siti <i>et al.</i> , 2015).....	21
Gambar 2.7	Intervensi terapeutik untuk perbaikan fungsi dan kuantitas EPC dengan target proses inflamasi dan stres oksidatif (Tousoulis <i>et al.</i> , 2008).....	24
Gambar 2.8	Umbi dan tanaman ubijalar ungu yang ditemukan di Bali.....	27
Gambar 2.9	Rumus bangun senyawa antosianin (Kim <i>et al.</i> , 2004).....	28
Gambar 2.10	Mekanisme kerja berbagai flavonoid pada sistem kardiovaskuler (Clark <i>et al.</i> , 2015).....	29
Gambar 2.11	Mekanisme seluler flavonoid dan metabolitnya dalam memproteksi sel terhadap inflamasi dan kerusakan oleh CysDA, DHBT-1 dan ROS (Spencer, 2010).....	33
Gamber 2.12	Metabolisme asam askorbat (May dan Harrison, 2013).....	35
Gambar 2.13	Askorbat (AA) atau DHA yang ditambahkan pada sel endotel yang dikultur pada membran semi berpori memasuki sel melalui transporter SVCT2 atau GLUT (May dan Harrison, 2013).....	36.
Gambar 2.14	Mekanisme kerja askorbat dalam proteksi kardiovaskuler terutama pada sel endotel (Trinidad <i>et al.</i> , 2013).....	40
Gambar 3.1	Kerangka konseptual penelitian.....	41
Gambar 4.1	Desain penelitian “ <i>post test only control group design</i> ”.....	43
Gambar 4.2	Alur penelitian.....	53

Gambar 5.1	Rerata proliferasi EPC pada kelompok kontrol dan kelompok eksperimen ekstrak umbi ubijalar ungu dengan MTT <i>cell proliferation assay</i> .....	56
Gambar 5.2	Rerata proliferasi EPC pada kelompok kontrol dan kelompok eksperimen vitamin C dengan MTT <i>cell proliferation assay</i> .....	57
Gambar 5.3	Perbandingan rerata proliferasi EPC pada kelompok eksperimen ekstrak umbi ubijalar ungu dan vitamin C dosis rendah (E <sub>1</sub> dan E <sub>4</sub> ), sedang (E <sub>2</sub> dan E <sub>5</sub> ) dan tinggi (E <sub>3</sub> dan E <sub>6</sub> ).....	59
Gambar 5.4	CFU dari EPC kontrol pada pengamatan hari keenam.....	60
Gambar 5.5	CFU dari EPC kelompok eksperimen ekstrak umbi ubijalar ungu dosis 1 mcg/ml dan dosis 25 mcg/ml pada hari keenam.....	60
Gambar 5.6	CFU dari EPC kelompok eksperimen vitamin C dosis 10 mcg/ml dan dosis 250 mcg/ml pada hari keenam.....	60
Gambar 5.7	Jumlah CFU pada kelompok kontrol, kelompok eksperimen ubi ungu dosis rendah dan dosis tinggi, dan kelompok eksperimen vitamin C dosis rendah dan dosis tinggi.....	61
Gambar 5.8	Ekspresi marker EPC pada pengamatan hari keenam.....	62

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1.	Dampak faktor risiko kardiovaskular terhadap jumlah dan fungsi EPC (Siddique <i>et al.</i> , 2010).....	16
Tabel 5.1	Karakteristik dasar subjek penelitian.....	55



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Lembar Pengumpulan Data Subjek Penelitian.....	84
Lampiran 2. Lembar Informasi dan Persetujuan Penderita.....	87
Lampiran 3. Pernyataan Persetujuan Mengikuti Penelitian.....	92
Lampiran 4. Hasil Analisis Statistik.....	93
Lampiran 5. Keterangan Kelaikan Etik.....	98

**DAFTAR SINGKATAN**

ACE	<i>Angiotensin Converting Enzyme</i>
acLDL	<i>Acetylated-Low Density Lipoprotein</i>
AGE	<i>Advanced Glycation End products</i>
ARB	<i>Angiotensin II Receptor Blocker</i>
CABG	<i>Coronary Artery Bypass Graft</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CFU	<i>Colony Forming Unit</i>
DHA	<i>Dehydroascorbate</i>
DPPH	<i>1,1-diphenil-2-picrylhydrazyl</i>
DPP4	<i>Dipeptidyl Peptidase 4</i>
EDHF	<i>Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor</i>
eNOS	<i>Endothelial Nitric Oxyde Synthase</i>
EPC	<i>Endothelial Progenitor Cell</i>
ERK	<i>Extracellular Signal-regulated Kinase</i>
ET-1	<i>Endothelin-1</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
Gpx-1	<i>Glutathione Peroxidase</i>
GULO	<i>Gulonolactone Oxidase</i>
HSC	<i>Hematopoeitic Stem Cells</i>
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HO-1	<i>Heme Oxygenase-1</i>
ICAM-1	<i>Intracellular Adhesion Molecule-1</i>
IL-6	<i>Interleukin-6</i>
IL-8	<i>Interleukin-8</i>
IMA	<i>Infark Miokard Akut</i>
JNK	<i>Jun N-terminal Kinase</i>
KDR	<i>Kinase Insert Domain Receptor</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MDA	<i>Malondialdehyde</i>

MEK	<i>Mitogen Activated Kinase</i>
MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i>
NADH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor-κB</i>
NO	<i>Nitric Oxide</i>
Nrf2	<i>Nuclear Factor Erhythroid 2 Realted Factor</i>
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>
Ox-LDL	<i>Oxidized-LDL</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCI	<i>Percutaneous Coronary Intervention</i>
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PI3K	<i>Phosphatidil Inositol 3-Kinase</i>
PJK	<i>Penyakit Jantung Koroner</i>
PPAR- γ	<i>Peroxisome Proliferator Activated Receptor-γ</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SDF-1	<i>Stromal Cell-Derived Factor-1</i>
SOD	<i>Superoxyde Dismutase</i>
SVCT2	<i>Sodium Vitamin C Co-Transporter</i>
TIMI	<i>Thrombolysis In Myocardial Infarction</i>
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i>
UEA-1	<i>Ulex Europaeus Agglutinin-1</i>
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR-2	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2</i>
VE-cadherin	<i>Vascular Endothelial-cadherin</i>
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>
vWF	<i>von Willebrand Factor</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Penyakit kardiovaskuler merupakan salah satu penyakit yang menyebabkan mortalitas dan morbiditas terbanyak di seluruh dunia. Menurut WHO didapatkan 17,3 juta kematian akibat penyakit kardiovaskuler yang terjadi setiap tahun dan diperkirakan akan mencapai 23,6 juta pada tahun 2030 (WHO, 2015). Penyakit jantung koroner (PJK) menjadi penyebab terbanyak kematian akibat penyakit kardiovaskuler. Di Amerika Serikat diperkirakan terdapat 16,8 juta penderita PJK, sedangkan prevalensi PJK di Indonesia pada tahun 2013 sebesar 1,5% atau sekitar 2,6 juta orang (Pusdatin, 2013). Berdasarkan *guideline* ESC tahun 2013, definisi dari PJK stabil adalah suatu penyakit dengan manifestasi nyeri dada yang disebabkan oleh suatu aktivitas atau stres akibat penyempitan  $\geq 50\%$  pada *left main coronary artery* atau  $\geq 70\%$  pada satu atau lebih arteri koroner mayor lainnya.

Patofisiologi yang mendasari PJK adalah aterosklerosis, suatu proses yang kompleks dan multifaktorial. Disfungsi endotel, inflamasi pembuluh darah, stres oksidatif, agregasi platelet dan proliferasi otot polos akan menyebabkan ketidakseimbangan homeostasis endotel sehingga mengganggu aliran darah koroner. Endotel merupakan regulator intrinsik terhadap tonus vaskuler, inflamasi lokal dan angiogenesis melalui sekresi bahan vasoaktif. Penemuan sel prekursor endotel pada individu dewasa yang dikenal sebagai *endothelial progenitor cell* (EPC) oleh Asahara dkk mengubah model patogenesis PJK. EPC dapat berdiferensiasi menjadi sel endotel matur dan berperan dalam perbaikan sel endotel

dan pertumbuhan vaskular baru (Siddique *et al.*, 2010). EPC terbukti berperan penting untuk pemulihan fungsi vaskular normal, menurunkan inflamasi vaskular, mencegah remodeling, angiogenesis, dan neovaskularisasi pembuluh darah. Respon EPC yang tidak adekuat menyebabkan gangguan pada reendotelialisasi dan inflamasi persisten sehingga menimbulkan gejala iskemia miokard (Oktaviono, 2014).

Dibanding individu sehat, pasien PJK stabil mengalami penurunan jumlah dan gangguan fungsi EPC yang berkorelasi negatif dengan jumlah faktor risiko kardiovaskuler (Vasa *et al.*, 2001). Sebaliknya, peningkatan jumlah EPC terjadi pada penderita infark miokard akut (IMA), angina pektoris tidak stabil, maupun paska *coronary artery bypass grafting* (CABG) (Siddique *et al.*, 2010). Faktor-faktor risiko kardiovaskuler klasik dapat menurunkan jumlah dan fungsi EPC melalui beberapa mekanisme seperti peningkatan apoptosis sel progenitor prematur dan peningkatan stres oksidatif, yang juga akan menstimulasi kematian sel. Selain itu, faktor risiko PJK dapat mengganggu jalur *signaling* yang mengatur diferensiasi atau mobilisasi EPC. Dari seluruh faktor risiko PJK, merokok terutama menyebabkan penurunan jumlah EPC, sedangkan kemampuan migrasi EPC berkorelasi negatif dengan hipertensi, usia, kadar kolesterol LDL dan kadar glukosa (Vasa *et al.*, 2001). Rendahnya jumlah EPC pada PJK dapat diakibatkan produksi yang kurang dari sumsum tulang, gangguan mobilisasi atau penggunaan yang berlebihan (Martí-Fàbregas *et al.*, 2015). Penurunan jumlah dan fungsi EPC ditunjukkan dengan penurunan marker penanda EPC, *colony forming unit* (CFU), kemampuan migrasi, adhesi, proliferasi, diferensiasi, dan kapasitas vaskulogenik EPC.

EPC pada individu sehat memiliki gen antioksidan endogen yang lebih tinggi dibandingkan sel endotel matur, sehingga EPC memiliki kadar *reactive oxygen species* (ROS) yang rendah dan lebih tahan terhadap kematian akibat ROS. Kondisi ini sesuai dengan karakteristik sel punca yang memiliki tingkat *survival* yang tinggi (Lin *et al.*, 2013). Stres oksidatif berperan dalam pemendekan telomer dan regulasi usia hidup EPC. Pada PJK terjadi proses stres oksidatif dan inflamasi yang eksekif sehingga mengganggu jumlah dan fungsi EPC. Sehingga diharapkan proteksi terhadap stres oksidatif dengan antioksidan endogen dan eksogen dapat mencegah kematian dan disfungsi EPC (Dernbach *et al.*, 2004).

Berbagai studi menunjukkan keuntungan yang diberikan terhadap EPC oleh terapi medikamentosa kardiovaskuler yang bersifat pleiotropik yaitu memiliki efek antioksidan dan antiinflamasi, seperti statin, *angiotensin-converting enzyme* (ACE) *inhibitor*, *angiotensin II receptor blocker* (ARB), *Peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR) *agonists*, gliptin (Lin *et al.*, 2013). Selain terapi medikamentosa, bahan makanan tertentu (*nutraceuticals*) dapat berfungsi sebagai antioksidan eksogen dan antiinflamasi, seperti flavonoid, curcumin, ginkgo biloba, vitamin C dan E (Herring dan Albrecht, 2005). Flavonoid merupakan gugus polifenol yang terdapat pada tumbuhan yang telah terbukti sebagai antioksidan kuat, melindungi endotel pembuluh darah serta menghambat aterosklerosis (Xu *et al.*, 2004). Efek antioksidan flavonoid didapat dari interaksi langsung dengan ROS serta stimulasi enzim antioksidan endogen dan hambatan terhadap xantin oksidase dan NAD(P)H oksidase. Flavonoid juga berinteraksi dengan kaskade *signalling* jalur *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K)/Akt dan *mitogen activated protein kinase* (MAPK) yang akan menghambat apoptosis dan meningkatkan *survival* dan

diferensiasi EPC (Spencer, 2010). Saat ini dikenal ribuan jenis flavonoid, salah satunya adalah antosianin (Ghosh dan Konishi, 2007). Antosianin terdapat pada umbi ubijalar ungu dengan konsentrasi cukup tinggi (Suprpta *et al.*, 2004). Penelitian telah menemukan bahwa antosianin pada umbi ubijalar ungu merupakan antioksidan *in vitro* dan *in vivo* yang kuat (Padda, 2006). Ekstrak air umbi ubijalar ungu yang mengandung kadar antosianin yang tinggi dapat meningkatkan ekspresi enzim antioksidan endogen superoksida dismutase (SOD) dan menurunkan *malondialdehyde* (MDA) pada hewan coba (Jawi *et al.*, 2008; Jawi dan Budiasa, 2001). Pemberian antosianin pada sel endotel *in vitro* dapat menghambat produksi interleukin proinflamasi seperti IL-6, IL-8 dan *monocyte-chemoattractant* (Xia *et al.*, 2007). Hingga saat ini, efek antosianin yang berasal dari umbi ubijalar ungu terhadap EPC belum pernah diteliti.

Vitamin C atau asam askorbat telah diketahui dapat mencegah oksidasi LDL dengan *scavenging* ROS serta memiliki efek protektif terhadap kerusakan endotel yang diinduksi lipid peroksida. Asam askorbat juga menghambat adhesi leukosit dengan sel endotel yang diinduksi oleh rokok dan LDL teroksidasi (Naidu, 2003). Kombinasi vitamin C dan E bekerja secara sinergis menghambat oksidasi LDL *in vitro*, menurunkan ekspresi *vascular endothelial growth factor* (VEGF), menurunkan aktivasi NAD(P)H oksidase sekaligus meningkatkan SOD sehingga menurunkan tingkat stres oksidatif (Li dan Schellhorn, 2007). Selain itu, asam askorbat terbukti meningkatkan proliferasi EPC secara signifikan melalui jalur MEK-ERK1/2 dengan meningkatkan sintesis kolagen (Cao *et al.*, 2012). Namun sebagian besar studi *in vivo* tidak menunjukkan keuntungan pemberian vitamin C dalam pencegahan penyakit kardiovaskuler. Selain itu peran asam askorbat

terhadap proliferasi EPC belum diketahui sehingga perlu diteliti lebih lanjut. Dalam penelitian ini akan dibuktikan efek antioksidan yang menguntungkan dari antosianin umbi ubijalar ungu dan vitamin C terhadap proliferasi EPC darah tepi penderita PJK stabil secara *in vitro*.

## **1.2 Rumusan Masalah**

1. Apakah ekstrak umbi ubijalar ungu (*Ipomoea batatas* L.) dosis rendah, sedang dan tinggi meningkatkan proliferasi EPC pada darah tepi penderita PJK stabil?
2. Apakah vitamin C dosis rendah, sedang dan tinggi meningkatkan proliferasi EPC pada darah tepi penderita PJK stabil?
3. Apakah terdapat perbedaan peningkatan proliferasi EPC pada darah tepi penderita PJK stabil antara pemberian ekstrak umbi ubijalar ungu (*Ipomoea batatas* L.) dan vitamin C?

## **1.3 Tujuan Penelitian**

### **1.3.1 Tujuan Umum**

Mengetahui efek pemberian ekstrak umbi ubijalar ungu (*Ipomoea batatas* L.) dan vitamin C terhadap proliferasi EPC penderita angina pektoris stabil.

### **1.3.2 Tujuan Khusus**

1. Mengetahui efek pemberian ekstrak umbi ubijalar ungu (*Ipomoea batatas* L.) dosis rendah, sedang dan tinggi terhadap proliferasi EPC pada darah tepi penderita PJK stabil.



2. Mengetahui efek pemberian vitamin C dosis rendah, sedang dan tinggi terhadap proliferasi EPC pada darah tepi penderita PJK stabil.
3. Mengetahui perbedaan antara efek pemberian ekstrak umbi ubijalar ungu (*Ipomoea batatas* L.) dan vitamin C terhadap proliferasi EPC pada darah tepi penderita PJK stabil.

#### **1.4 Manfaat Penelitian**

##### **1.4.1 Manfaat Teoritis**

Menambah pengetahuan mengenai peran antioksidan terhadap proliferasi EPC.

##### **1.4.2 Manfaat Praktis**

1. Sebagai bahan pertimbangan penggunaan bahan makanan berupa umbi ubijalar ungu dan vitamin C sebagai salah satu bagian dari tatalaksana PJK stabil.
2. Sebagai dasar ilmiah atau pengetahuan bahwa upaya peningkatan EPC sirkulasi pada penderita PJK stabil dapat dilakukan.
3. Landasan bagi penelitian berikutnya mengenai pengaruh pemberian antioksidan terhadap proliferasi EPC pada darah tepi penderita PJK stabil.

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

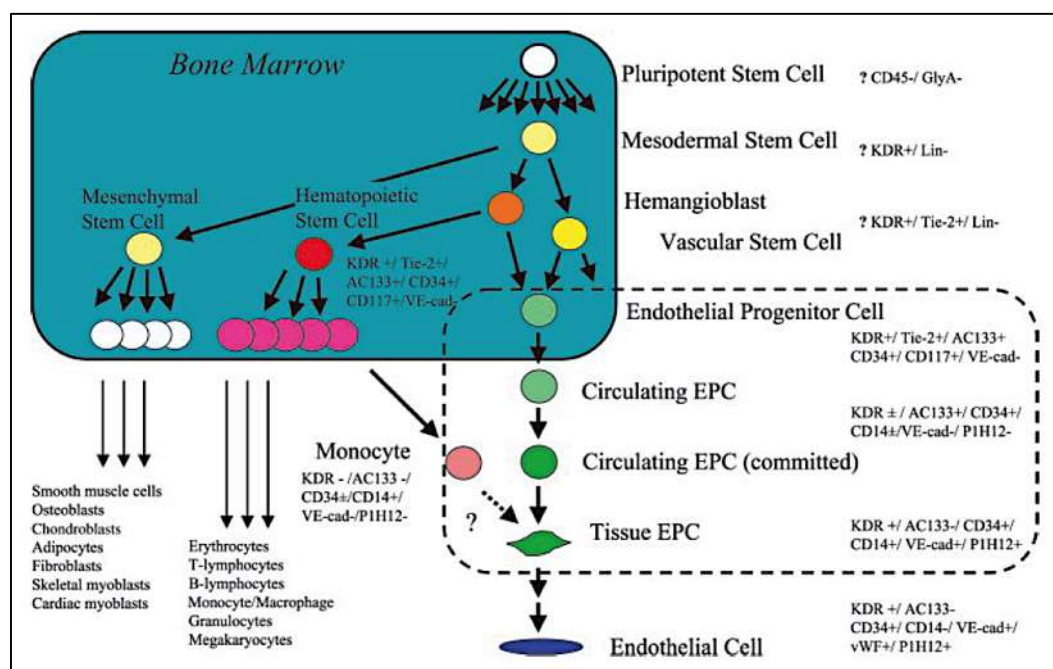
#### 2.1 *Endothelial Progenitor Cell (EPC)*

##### 2.1.1 Karakteristik dan Identifikasi EPC

EPC pertama kali ditemukan oleh Asahara dkk (1997) yang berhasil mengisolasi sel CD34<sup>+</sup> menggunakan *magnetic micro beads*. EPC merupakan bagian dari *mononuclear cell* (MNC) yang dapat berikatan dengan molekul matriks seperti fibronektin dan menunjukkan positività terhadap *acetylated LDL* (acLDL) dan *Ulex europaeus agglutinin 1 plant* (UEA-1) *lectin* (Liew et al., 2006). Secara *in vivo*, sel endotel dapat berasal dari *hematopoietic stem cell* (HSC), *common myeloid progenitor*, *granulocyte macrophage progenitor*, *mesenchymal stem cell*, maupun monosit (Gambar 2.1). EPC memiliki kemampuan untuk proliferasi dan diferensiasi namun lebih terbatas dibanding sel punca. Sel ini bersifat unipoten dan hanya dapat berdiferensiasi menjadi sel endotel matur (Leone *et al.*, 2009).

EPC menunjukkan ekspresi penanda yang khas yaitu *cluster of differentiation* (CD) 133, CD34, *vascular endothelial growth factor receptor-2* (VEGFR-2) yang disebut juga *kinase insert domain receptor* (KDR) atau *fetal liver kinase-1* (Flk-1) (Xu *et al.*, 2008). EPC muda yang terdapat pada sumsum tulang atau segera setelah migrasi ke sirkulasi sistemik akan positif terhadap CD133, CD34, dan VEGFR-2, sedangkan EPC yang lebih matang akan kehilangan CD133 dan positif terhadap CD34, VEGFR-2, CD31, *vascular endothelial* (VE)-*cadherin*, serta *von Willebrand factor* (vWF). Hilangnya CD133 merefleksikan perubahan

EPC pada sirkulasi menjadi sel yang matang (Hristov et al. 2003; Goon *et al.*, 2006; Fadini et al., 2007; Jeong *et al.*, 2010).

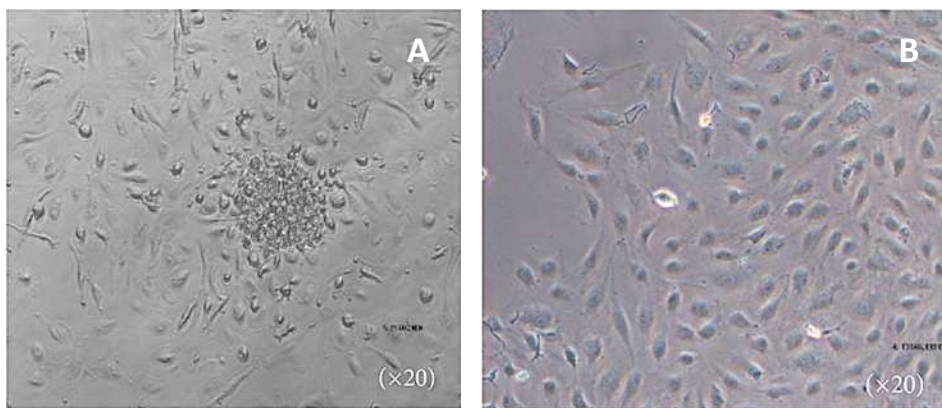


**Gambar 2.1** Skema kaskade putatif dan profil diferensiasi EPC yang berasal dari sumsum tulang (Asahara dan Kawamoto, 2004).

EPC di sirkulasi dibagi menjadi dua subpopulasi dengan pola pertumbuhan sel dan kemampuan sekresi faktor angiogenik yang berbeda, yaitu *early* EPC dan *late* EPC (Gambar 2.2). *Early* EPC merupakan populasi EPC angiogenik yang didapatkan dari kultur *in vitro* jangka pendek selama empat hingga tujuh hari. *Early* EPC berbentuk *spindle* dan mengekspresikan CD31, CD34, CD105, CD146, VE-cadherin dan VEGFR-2. Sel ini diduga berasal dari monosit darah tepi (*non hematopoietic stem cell*). *Early* EPC memiliki kemampuan proliferasi dan diferensiasi endotel yang rendah sehingga diduga sel ini memberikan keuntungan melalui sekresi *growth factors*.

*Late* EPC atau *outgrowth* EPC berbentuk seperti *cobblestone* menyerupai sel endotel dan diduga berasal dari HSC sumsum tulang yang dapat bermigrasi

menuju sirkulasi sistemik jika terdapat stimulasi dari kerusakan vaskuler. Sel ini didapatkan dari kultur *in vitro* jangka panjang yaitu selama dua-tiga minggu. *Late* EPC memiliki kemampuan *tubular formation in vitro* yang lebih baik dibanding *early* EPC, dan dapat berdiferensiasi menjadi sel endotel matur dan berperan dalam proses angiogenesis dan vaskulogenesis. *Late* EPC menunjukkan ekspresi eNOS, caveolin-1, VE cadherin dan KDR, selain ekspresi CD31, CD34, CD133 dan VEGFR-2 (Liew *et al.*, 2006).



**Gambar 2.2** Morfologi *early* EPC dan *late* EPC. Koloni *early* EPC terdiri dari sel berbentuk bulat dan *spindle* (A) sedangkan *late* EPC berbentuk *cobblestone* menyerupai sel endotel matur (Tagawa *et al.*, 2015).

EPC dapat diisolasi dan dikultur dari sumsum tulang, darah tepi, tali pusat serta jaringan tubuh lainnya (lemak, hati, jantung, limpa, dan saluran pencernaan). Isolasi dan kuantifikasi EPC dapat dilakukan melalui 2 metode, yaitu seleksi kultur karena sifat adhesi dan pertumbuhan *in vitro* dan seleksi berdasarkan fenotip sel menggunakan agen berlabel fluoresensi dan dibaca dengan *flow cytometer* (Hirschi *et al.*, 2008). Pada metode pertama, sel diisolasi kemudian dikultur dalam medium dengan penambahan *growth factor* spesifik. Inkubasi *in vitro* dengan campuran *growth factor*, adhesi pada fibronectin dan kontak dengan *extracellular matrix* akan mempengaruhi proliferasi atau diferensiasi EPC yang berasal dari sumsum tulang.

Setelah mengalami adhesi, EPC akan kehilangan sifat progenitornya dan mulai berdiferensiasi. Dalam tiga hingga empat minggu akan terbentuk EPC dalam satu lapisan seperti sel endotel. Metode yang kini lebih sering digunakan merupakan modifikasi oleh Hill dkk (2003), yang telah digunakan untuk menunjukkan hubungan terbalik antara konsentrasi CFU-Hill dengan skor risiko Framingham untuk kardiovaskular. Hill mengisolasi dan mengkultur sel mononuklear pada piringan yang dilapisi fibronektin. Setelah inkubasi selama 24 jam, sel yang tidak melekat dikeluarkan dan dikultur kembali ke piringan yang dilapisi fibronektin selama 48 jam dan perhitungan *colony forming units* (CFU) dilakukan beberapa hari kemudian (Hristov *et al.*, 2003; Hirschi *et al.*, 2008). Metode kedua menilai kemampuan cerna dari sel yang melekat terhadap acLDL dan UEA-1 *lectin* yang berlabel fluoresensi. Sel yang melekat dan berikatan dengan kedua agen dinilai sebagai EPC, kemudian dikonfirmasi dengan penanda endotel seperti VEGFR-2, CD34, vWF, *VE-cadherin*, dengan metode *flow cytometry*. Metode ini telah digunakan untuk mengisolasi EPC dari monosit darah perifer (Hirschi *et al.*, 2008). Sedangkan penilaian fungsi EPC dapat dilakukan dengan berbagai cara melalui pemeriksaan yang menilai kemampuan adhesi, migrasi, proliferasi, apoptosis dan *tubule formation* dari EPC (Sukmawati dan Tanaka, 2015).

### **2.1.2. Proliferasi EPC**

Proses proliferasi EPC diregulasi oleh berbagai *growth factors* dan transduksi jalur sinyal pada sel. *Growth factors* merupakan senyawa berupa protein atau hormon steroid yang berfungsi menjaga sel tetap hidup serta menstimulasi pertumbuhan, proliferasi, dan diferensiasi sel. Tanpa adanya stimulus *growth factor*, sel akan mengalami apoptosis. Beberapa jenis *growth factors* telah terbukti

berperan dalam proses migrasi, proliferasi serta diferensiasi sel. VEGF menstimulasi sel dengan cara mengikat VEGFR pada permukaan sel yang menyebabkan dimerisasi dan menjadi aktif melalui transfosforilasi. Ikatan VEGF dengan VEGFR-2 penting sekali dalam proses vaskulogenesis dan angiogenesis. Insulin-like growth factors-1 (IGF-1) terbukti berperan dalam proliferasi sel dan menghambat apoptosis, sedangkan *fibroblast growth factors* (FGF) 1 dan 2 menginduksi proliferasi sel endotel dan mengorganisasi sel endotel menjadi struktur berbentuk tabung serta menginduksi angiogenesis (Holmes et al., 2007).

Transduksi sinyal adalah suatu proses yang diawali oleh aktivasi reseptor yang berada di membran oleh sinyal molekul dari luar sel yang kemudian mengakibatkan molekul dari dalam sel mengeluarkan respon tertentu (Xu *et al.*, 2008). Jalur Ras-Raf-MEK-ERK (MAPK) dan PI3K/Akt berperan penting dalam transmisi sinyal untuk regulasi *survival* sel, proliferasi, metabolisme, dan migrasi. Aktivasi jalur PI3K/Akt memperbaiki *survival* sel endotel dengan menghambat apoptosis, menstimulasi sintesis NO endotel dan mediasi migrasi sel endotel yang diinduksi VEGF. Jalur sinyal MAPK terlibat dalam beberapa peran biologis seperti pertumbuhan dan perkembangan normal sel serta dapat merespon stres terhadap beberapa stimulus dari luar sel. Di antara beberapa jenis MAPK, ERK1/2 dianggap terkait langsung dengan proliferasi dan kelangsungan hidup sel. ERK yang teraktivasi memasuki nukleus untuk mengaktifkan faktor transkripsi dan mengubah ekspresi gen untuk meningkatkan pertumbuhan, diferensiasi, dan mitosis (Zhang dan Hui, 2002).

Proliferasi sel dibatasi oleh kemampuan sel untuk membelah dan onset penuaan sel. Hampir seluruh sel mamalia akan mengalami sejumlah pembelahan

sel, kemudian memasuki fase tanpa pembelahan yang dikenal sebagai *senescence* atau penuaan sel. Proses ini berjalan seiringan dengan apoptosis (kematian sel yang terprogram) dan keduanya dapat menghambat proliferasi sel. Telomer merupakan kompleks *non-nucleosomal* DNA/protein yang terletak di ujung akhir kromosom dan berfungsi sebagai *protective cap* pada replikasi sel. Setiap pembelahan sel mengakibatkan pemendekan telomer. Telomer yang sangat pendek akan mencetuskan terjadinya penuaan sel untuk mencegah proliferasi sel yang tidak terbatas. Telomerase merupakan enzim *reverse transcriptase* sel yang mengkatalis sintesis dan ekstensi dari DNA telomer. Telomerase bertugas untuk meregulasi proliferasi sel pada sel somatik normal melalui pemanjangan telomer atau mekanisme yang independen terhadap panjang telomer. Berkurangnya aktivitas telomerase akibat ROS, salah satunya melalui inaktivasi jalur Akt, diduga mencetuskan terjadinya penuaan sel ini. Faktor pro-aterosklerosis terbukti mengganggu aktivitas telomerase pada sel endotel matur (Yao *et al*, 2006; Imanishi *et al.*, 2008).

### **2.1.3 Peran EPC dalam Regenerasi Endotel dan Neovaskularisasi**

Endotelium merupakan organ terbesar di dalam tubuh manusia yang tersusun sebagai sel satu lapis. Endotel merupakan pembatas yang dinamis antara sirkulasi darah dan jaringan sekitarnya, berperan dalam regulasi ekstravasasi leukosit, pencegahan adhesi platelet yang memicu proses trombosis, dan regulasi patensi pembuluh darah untuk menjamin aliran darah. Gangguan keseimbangan pada berbagai proses tersebut di atas dapat memicu terjadinya disfungsi endotel (Wu *et al.*, 2005). EPC berperan penting proses neovaskularisasi dan remodelisasi sel endotel pada pembuluh darah yang mengalami kerusakan melalui pergantian sel

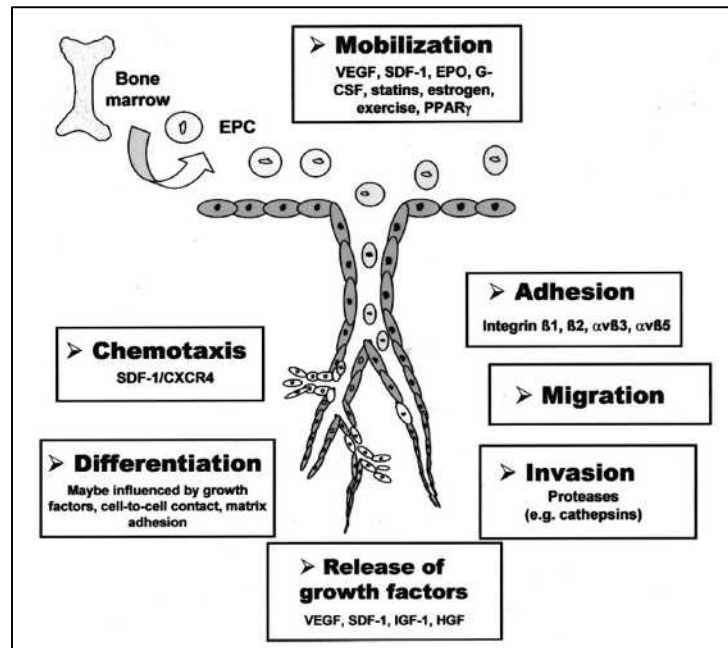
endotel yang rusak sehingga integritas pembuluh darah tetap terjaga (Leone *et al.*, 2009).

EPC dapat berperan dalam proses neovaskularisasi secara langsung dan tidak langsung. Secara langsung, EPC berperan dalam vaskulogenesis pada area iskemia melalui migrasi, proliferasi, dan diferensiasi *in situ*. EPC juga terlibat dalam proses angiogenesis, dimana EPC memproduksi *growth factors* dan sitokin proangiogenik yang akan mendorong proliferasi dan migrasi sel endotel yang sudah ada. Kerja parakrin EPC ini menunjukkan perannya secara tidak langsung dalam proses neovaskularisasi, dibuktikan dengan adanya berbagai sitokin dan faktor proangiogenik lainnya yang disekresi EPC seperti VEGF, SDF-1 $\alpha$ , dan eNOS (Asahara *et al.*, 2011).

Pada kondisi fisiologis, sebagian besar EPC terdapat pada sumsum tulang, sedangkan hanya sedikit jumlah sel yang beredar di sirkulasi perifer. Mobilisasi EPC dari sumsum tulang menuju darah tepi merupakan proses patologis yang diinduksi *angiogenic growth factor* akibat iskemia, trauma jaringan, penyembuhan luka atau pertumbuhan tumor. Mobilisasi EPC terjadi ketika kadar sitokin dalam darah melebihi kadar dalam sumsum tulang. Sitokin akan mengaktifasi produksi eNOS dan NO, yang akan mengaktifasi *matrix metalloproteinase* (MMP) (Salingova *et al.*, 2014). Regulasi pelepasan EPC dari sumsum tulang diatur oleh rangkaian *growth factors*, enzim, ligan serta reseptor di permukaan sel. Langkah awal pelepasan EPC dimulai dari aktivasi MMP-9 yang akan menginduksi transformasi dari *membrane-bound Kit ligand* menjadi *soluble Kit ligand* dan menggerakkan cKIT<sup>+</sup> hemangioblas ke dalam *vascular zone* dari sumsum tulang. *Growth factors* diduga sebagai pencetus perubahan hemangioblas menjadi EPC,



seperti pada kondisi iskemia akut didapatkan jumlah EPC yang meningkat disertai peningkatan kadar VEGF endogen. Proses diferensiasi EPC (Gambar 2.3) dimulai dari migrasi EPC dari sumsum tulang menuju sirkulasi sistemik dan berakhir setelah terjadinya *homing* (adhesi dan masuknya EPC pada lapisan sel endotel matur) (Wu *et al.*, 2005; Hristov *et al.*, 2003).



**Gambar 2.3** Mekanisme *homing* dan diferensiasi EPC. Rekrutmen EPC menuju jaringan iskemia membutuhkan proses yang kompleks meliputi mobilisasi, kemoatraksi, adhesi, transmigrasi, invasi ke jaringan dan diferensiasi in situ. Faktor yang berperan dalam regulasi masing-masing tahap telah tercantum (Urbich dan Dimmeler, 2004).

Berbagai faktor dapat mempengaruhi kecepatan terkumpulnya EPC menuju target vaskular, termasuk sumber sel dan derajat beratnya iskemia (Shantsila, 2007). Pada beberapa studi pada hewan, transfusi kultur sel mononuklear pada medium angiogenik berhasil menimbulkan reendotelialisasi dan mengurangi hiperplasia neointima. Namun diferensiasi sel tersebut menjadi sel endotel belum dapat dipastikan. Penelitian yang dilakukan pada pasien dengan disfungsi ventrikel kiri dan iskemia miokard menunjukkan infus sel progenitor tidak memberikan keuntungan klinis. Beberapa studi bahkan menunjukkan adanya peningkatan

insidensi kejadian koroner termasuk restenosis dan trombosis setelah infus sel progenitor CD133 (Khakoo, 2005; Padfield *et al.*, 2010).

#### **2.1.4 Dampak faktor risiko PJK terhadap EPC**

Berbagai faktor risiko aterosklerosis dianggap berpengaruh langsung pada kerusakan endotel dan terbukti memberikan efek merugikan terhadap jumlah maupun fungsi EPC (Gambar 2.4) (Urbich, 2004; Khakoo, 2005). Jumlah dan fungsi EPC berbanding terbalik dengan jumlah faktor risiko tradisional PJK (Tabel 2.1), seperti diabetes mellitus, hiperkolesterolemia, merokok dan hipertensi (Vasa *et al.*, 2001). Faktor risiko lainnya seperti inflamasi ringan dan hiperhomosisteinemia juga terkait dengan gangguan jumlah dan fungsi EPC (Liew *et al.*, 2006). Kadar EPC dalam sirkulasi merupakan prediktor reaktivitas vaskuler yang lebih baik dibanding skor faktor risiko Framingham (Hill *et al.*, 2003). Rendahnya jumlah EPC mengindikasikan besarnya risiko aterosklerosis, serta merupakan faktor prediktor untuk peningkatan derajat keparahan dan mortalitas penyakit kardiovaskular (Wu *et al.*, 2005; Banerjee *et al.*, 2006). Studi lain menyebutkan bahwa EPC sirkulasi merupakan penentu independen derajat keparahan PJK secara angiografi. Deplesi EPC akan mengurangi kemampuan perbaikan endotel sehingga memicu terbentuknya plak aterosklerotik. EPC tidak hanya sangat penting dalam mempertahankan integritas endotel dan homeostasis pembuluh darah, namun jumlahnya di darah perifer merupakan ukuran pengganti yang kuat dan cermin dari kapasitas regeneratif dari beban aterosklerosis (Fadini *et al.*, 2007). Mekanisme yang mendasari penurunan jumlah EPC pada PJK stabil yaitu terjadinya penurunan mobilisasi EPC dari sumsum tulang, peningkatan konsumsi EPC pada lokasi pembuluh darah yang cedera, dan penurunan *half life* dari EPC yang berada di

sirkulasi akibat paparan faktor risiko kardiovaskuler. Namun, fakta bahwa pasien PJK mengalami peningkatan mobilisasi EPC pada pemberian *granulocyte-colony stimulating factor*, statin, dan olahraga menunjukkan bahwa kemungkinan faktor risiko kardiovaskuler lebih cenderung menyebabkan *downregulation* jalur sinyal yang mengatur pelepasan EPC dibanding meningkatkan konsumsi EPC itu sendiri (Yao *et al.*, 2006).

**Tabel 2.1 Dampak faktor risiko kardiovaskular terhadap jumlah dan fungsi EPC** (Siddique *et al.*, 2010).

Faktor Risiko Kardiovaskular	Dampak terhadap jumlah dan fungsi EPC	Kategori EPC
Hiperkolesterolemia	Penurunan jumlah EPC, gangguan migrasi EPC	<i>Circulating</i> EPCs (CD133, 34, 45), CFU-ECs
Diabetes melitus	Penurunan jumlah EPC, gangguan migrasi EPC	<i>Circulating</i> EPCs (CD133, 34, KDR), CFU-ECs
Hipertensi	Jumlah EPC berbanding terbalik dengan tekanan darah sistolik	<i>Circulating</i> EPCs (CD133, 34, KDR)
Merokok	Mempengaruhi jumlah EPC secara <i>dose-dependent</i>	<i>Circulating</i> EPCs (CD133, 34, KDR), CFU-ECs
Penuaan	Penurunan proliferasi dan migrasi	<i>Circulating</i> EPCs (CD133, 34, 45), CFU-ECs
Aktivitas Fisik	Peningkatan jumlah dan fungsi EPC	<i>Circulating</i> EPCs (CD133, 34, 45), CFU-ECs

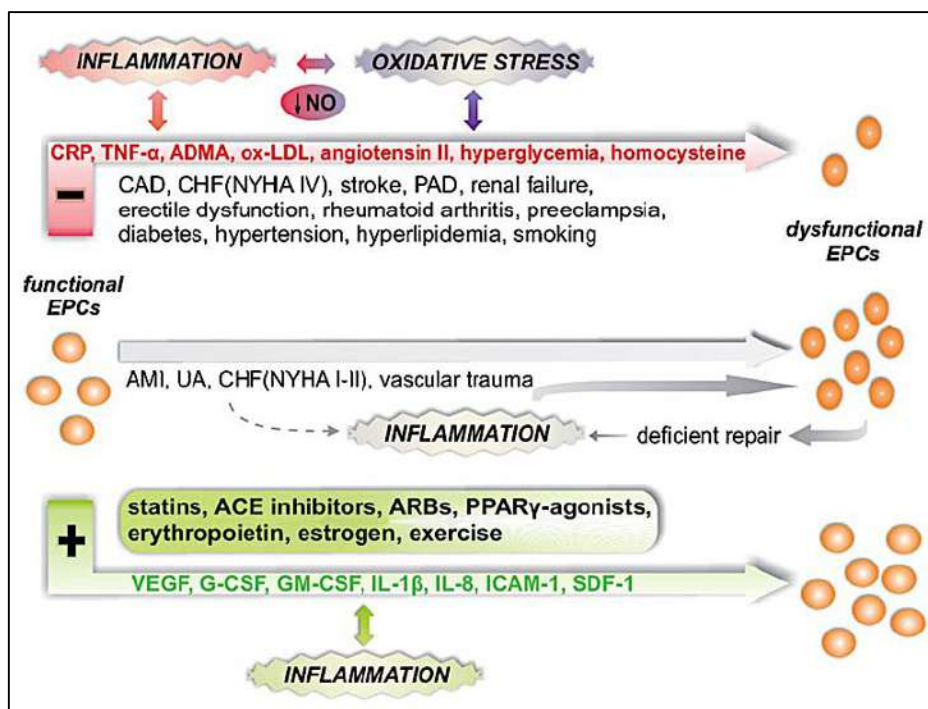
Studi pada binatang secara definitif menunjukkan bahwa iskemia jaringan meregulasi pelepasan *growth factors* dan sitokin yang menstimulasi pengeluaran EPC melalui eNOS dan *MMP-dependent pathways* (Fadini *et al.*, 2007). Pada kondisi akut seperti iskemia tungkai akut, IMA, luka bakar, serta CABG, jumlah EPC di sirkulasi meningkat sangat cepat sebagai respon akut terhadap cedera vaskular (Patel *et al.*, 2010). Kejadian infark miokard, angina tidak stabil dan cedera vaskular langsung diikuti oleh peningkatan mendadak EPC dan kembali ke tingkat basal setelah 1-2 minggu. Reaksi ini bertujuan untuk membatasi kerusakan jaringan dan meningkatkan regenerasi awal melalui umpan balik homeostasis. Beberapa kasus menunjukkan bahwa tingkat mobilisasi EPC setelah IMA adalah prediktor

independen perbaikan fungsi ventrikel dalam satu tahun. Namun, kemampuan mobilisasi EPC pada kondisi akut belum diketahui hingga saat ini (Fadini *et al.*, 2007).

Usia berkorelasi negatif dengan jumlah maupun fungsi EPC, termasuk diferensiasi, proliferasi, dan migrasi EPC. Jenis kelamin juga berpengaruh pada EPC, dimana hormon estrogen memiliki efek kardioprotektif pada wanita melalui regulasi jumlah dan fungsi EPC. Kebiasaan merokok merupakan pemicu kuat terjadinya disfungsi endotel. Pada perokok didapatkan penurunan jumlah EPC dan gangguan fungsi EPC secara global (Fadini *et al.*, 2007; Shantsila *et al.*, 2007).

Hipertensi merupakan faktor prediktor terkuat untuk terjadinya gangguan migrasi EPC. Angiotensin II menginduksi stres oksidatif, sehingga secara negatif memodulasi EPC, menurunkan aktivitas telomerase dan mempercepat penuaan EPC. Angiotensin II mempercepat onset penuaan EPC melalui peningkatan ekspresi gp91phox. Selain itu, pada hipertensi didapatkan peningkatan aldosteron yang dapat menghambat generasi dan diferensiasi EPC melalui penurunan VEGF dan jalur Akt (Liew *et al.*, 2006; Fadini, 2007; Shantsila, 2007).

Pada pasien diabetes melitus (DM) tipe 2, jumlah EPC di sirkulasi berbanding terbalik dengan kadar gula darah dan terdapat penurunan proliferasi dan fungsi EPC yang dinilai dari berkurangnya kemampuan adhesi dan *tubule formation* secara *in vitro*. Penurunan jumlah dan fungsi EPC pada DM diperkirakan akibat stres oksidatif yang merusak jalur PI-3K/Akt sehingga menurunkan diferensiasi dan integrasi struktur vaskular dan menginduksi apoptosis. (Liew *et al.*, 2006).



**Gambar 2.4 Faktor inflamasi dan oksidatif yang mempengaruhi jumlah dan fungsi EPC.** Rangsangan inflamasi dapat mempengaruhi EPC secara positif maupun negatif (ditunjukkan dengan tanda panah hijau dan merah). Inflamasi dan EPC yang buruk dapat meningkat jika terjadi defisiensi regenerasi endotel (tanda panah hijau). Bagian atas menunjukkan kondisi yang berkaitan dengan jumlah EPC yang rendah (tanda -), bagian bawah menunjukkan kondisi dan terapi yang dapat meningkatkan jumlah EPC (tanda +) (Tousolis *et al.*, 2008).

Hiperkolesterolemia dikaitkan dengan penurunan jumlah maupun fungsi EPC. Secara *in vivo*, suplementasi *high-density lipoprotein* (HDL) mampu mencegah apoptosis EPC, meningkatkan ekspresi eNOS, dan merangsang perbaikan endotel yang dimediasi oleh EPC. Sebaliknya, terapi *low-density lipoprotein* (LDL) dan *very low-density lipoprotein* (VLDL) menurunkan jumlah CFU EPC, sedangkan *oxidized-LDL* (ox-LDL) dapat menurunkan jumlah EPC, memicu gangguan aktivitas fungsional dan mempercepat penuaan EPC, yang kemungkinan disebabkan oleh inaktivasi telomerase. Selain itu, ox-LDL dapat merusak VEGF yang penting dalam proses diferensiasi EPC melalui defosforilasi Akt (Fadini, 2007; Shantsila, 2007).

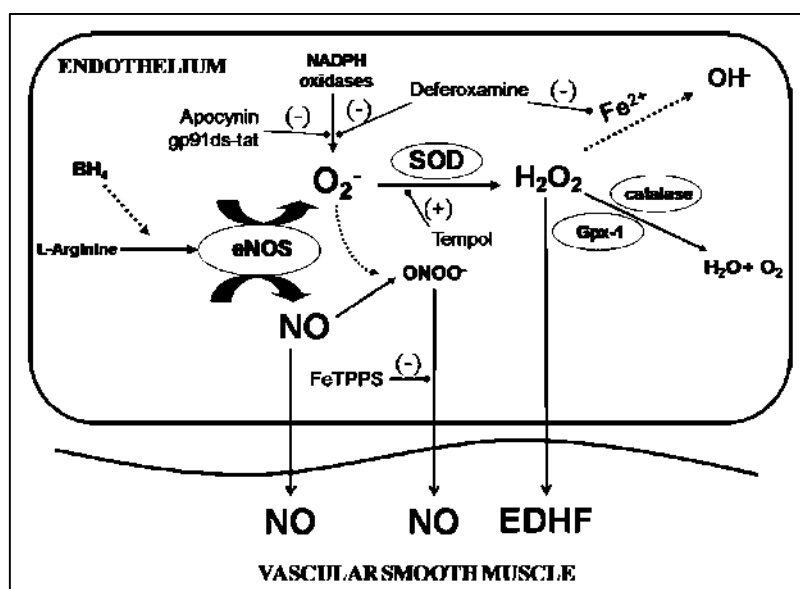
## 2.2 Stres Oksidatif dan Antioksidan pada Penyakit Kardiovaskuler

### 2.2.1 Stres Oksidatif pada Sistem Kardiovaskuler

Stres oksidatif adalah suatu keadaan dimana terjadi kelebihan *reactive oxygen species* (ROS) sehingga melampaui kemampuan antioksidan endogen untuk menetralkan ROS tersebut (Taniyama dan Griendling, 2003). Radikal bebas dan ROS (radikal hidroksil, radikal peroksil dan anion superoksida) merupakan senyawa yang selalu terbentuk akibat reaksi metabolisme. Pada kondisi normal, ROS akan dinetralkan oleh antioksidan endogen, yaitu superoksida dismutase (SOD), glutathione peroxidase (Gpx-1), katalase dan enzim lain, sehingga tidak terjadi kerusakan oksidatif. ROS dan radikal bebas lain dalam konsentrasi rendah hingga sedang bermanfaat bagi sel sebagai mediator regulator dalam proses *signaling* dan menjaga keseimbangan reaksi redoks. Peran ROS sebagai *signalling molecule* juga sangat penting pada sistem kardiovaskuler. Peningkatan produksi ROS secara akut maupun kronis menimbulkan perubahan di dalam sel melalui beberapa mekanisme, yaitu mempengaruhi redoks di dalam sel, modifikasi oksidatif protein spesifik dan sebagai *second messengers* (Clempus dan Griendling, 2006).

Efek stres oksidatif terhadap sistem kardiovaskuler meliputi apoptosis sel endotel yang diinduksi ROS (Dimmeler *et al.*, 1999; Dimmeler dan Zeiher, 2000), induksi proses inflamasi melalui perubahan oksidatif dari ekspresi gen proinflamasi (De Keulenaer *et al.*, 2000) dan adhesi leukosit (Marui *et al.*, 1993), penurunan bioavailabilitas NO di intraseluler (Forstermann dan Munzel, 2006), dan oksidasi LDL (Stocker dan Keaney, 2004). Semua efek ini bertanggungjawab dalam manifestasi penyakit kardiovaskuler.

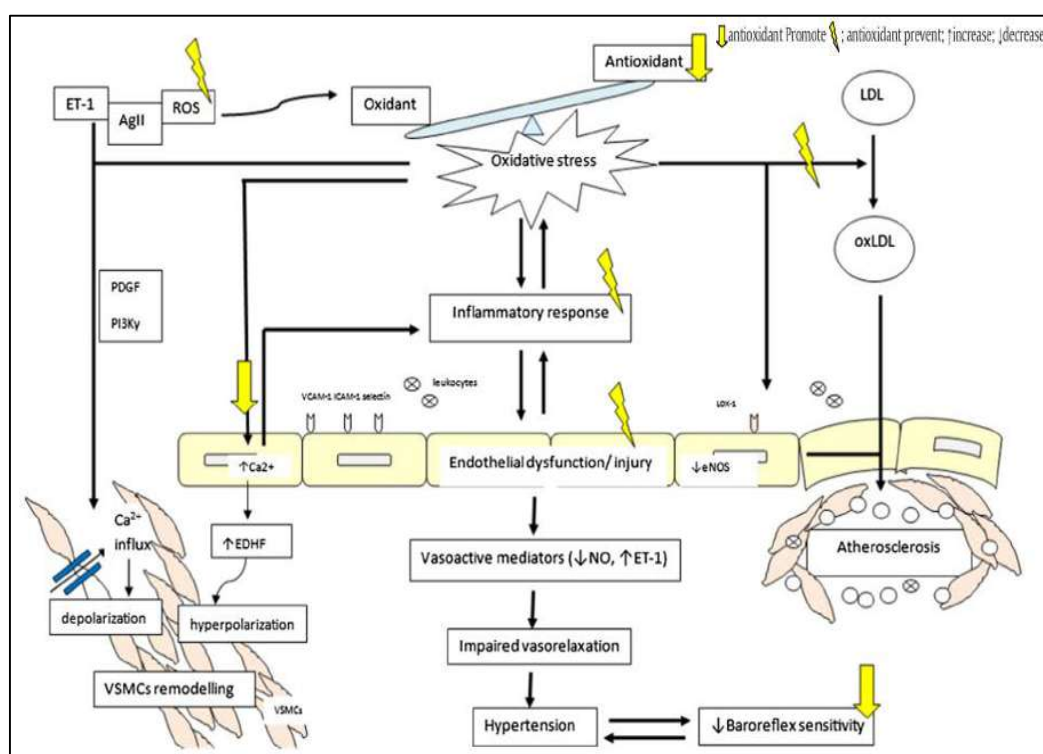
Pada endotel pembuluh darah, ROS yang terpenting adalah ion superoksida. Sumber dari ion superoksida adalah reduksi univalen dari oksigen atas pengaruh enzim NAD(P)H oksidase dan xanthine oksidase (Gambar 2.5). Percobaan pada kultur jaringan dan binatang menunjukkan bahwa peran NAD(P)H oksidase sangat dominan dalam proses aterosklerosis melalui peningkatan produksi ROS. Aktivitas NAD(P)H oksidase pada endotel dapat dirangsang oleh berbagai agonis seperti angiotensin II, platelet derived growth factor (PDGF), trombin dan TNF- $\alpha$ .



**Gambar 2.5 Efek ROS terhadap endotel pembuluh darah.** Ion superoksida ( $O_2^-$ ) terbentuk dari *uncoupling* eNOS dan NAD(P)H oksidase. Superoksida akan cepat bereaksi dengan NO membentuk peroxynitrit ( $ONOO^-$ ). SOD menangkap superoksida dan membentuk vasodilator  $H_2O_2$ . Jika terdapat logam katalis (contoh:  $Fe^{2+}$ ),  $H_2O_2$  akan membentuk vasokonstriktor poten  $OH$ .  $H_2O_2$  dapat dikonversi menjadi  $H_2O$  dan  $O_2$  jika terdapat enzim katalase atau Gpx-1 (Sindler *et al.*, 2013).

Herrman dkk (2007) melaporkan stres oksidatif menimbulkan gangguan fungsi endotel sehingga terjadi aterosklerosis pada babi yang diberikan pakan tinggi kolesterol selama 12 minggu. Gangguan fungsi endotel ini disebabkan peningkatan ROS yang menyebabkan terbentuknya *uncoupling* eNOS. *Uncoupling* eNOS tidak dapat membentuk NO sehingga peningkatannya akan menurunkan bioavailabilitas

NO yang akan mengganggu vasorelaksasi *endothelium-dependent*. Selain itu, *uncoupling* eNOS akan membentuk ion superoksid dari molekul oksigen sehingga memperberat gangguan fungsi endotel (Gambar 2.6). Ion superoksid bila tidak dinetralkan oleh antioksidan akan menyebabkan kerusakan endotel dan kemudian menimbulkan aterosklerosis (Lin *et al.*, 2005).



**Gambar 2.6 Keterlibatan stres oksidatif, inflamasi dan antioksidan pada level vaskuler.** Stres oksidatif dapat dicetuskan oleh stimulan prooksidan seperti ROS, Angiotensin-II, ET-1 dan sel inflamasi. Stres oksidatif mencetuskan inflamasi yang kemudian akan menyebabkan disfungsi endotel. Stres oksidatif dapat merangsang influx  $\text{Ca}^{2+}$  yang memperberat respons inflamasi. Prooksidan dan proinflamasi merupakan mediator influx  $\text{Ca}^{2+}$  yang akan menimbulkan vasokonstriksi. Antioksidan bekerja sebagai *scavenger* ROS, meningkatkan enzim antioksidan endogen, mengurangi inflamasi dan stres oksidatif, memperbaiki EDHF dan sensitivitas barorefleks dan mencegah disfungsi endotel (Siti *et al.*, 2015).

Peningkatan produksi superoksida akan menurunkan jumlah dan fungsi EPC. Inkubasi EPC dengan kadar hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) yang tinggi akan menginduksi terjadinya apoptosis sehingga menurunkan jumlah EPC. Peningkatan



ROS atau radikal bebas akan merusak endotel sehingga mudah ditembus ox-LDL yang masuk ke dalam dinding pembuluh darah. Ox-LDL, yang merupakan mediator stres oksidatif seluler, akan menimbulkan kerusakan endotel lebih lanjut sehingga endotel akan mengekspresikan berbagai molekul adhesi yang merangsang terjadinya ikatan endotel dengan monosit dan leukosit. Aktivasi endotel oleh berbagai sebab lain juga akan menyebabkan terekspresinya molekul adhesi VCAM-1 dan ICAM-1. Pada daerah endotel yang teraktivasi, VCAM-1 akan berikatan dengan leukosit terutama monosit dan limfosit melalui integrin. Monosit yang telah menempel pada endotel selanjutnya akan masuk ke dalam intima arteri. Peristiwa ini adalah awal dari inflamasi endotel atau aterogenesis. Ox-LDL terbukti mempercepat onset kematian EPC. Sedangkan *high-density lipoprotein* (HDL), yang dianggap bersifat ateroprotektif karena sifat antioksidan dan antiinflamasi, memiliki pengaruh positif terhadap fisiologi EPC (Lin *et al.*, 2013).

Stres oksidatif juga berperan pada pemendekan telomer dan mempengaruhi usia hidup sel. Salah satu mekanisme yang mendasari penuaan sel akibat ROS adalah gangguan pada telomerase yang bertugas memperbaiki kerusakan DNA akibat proses oksidasi. Sehingga diduga proteksi terhadap stres oksidatif dapat mencegah penuaan sel dan disfungsi EPC (Yao *et al.*, 2006).

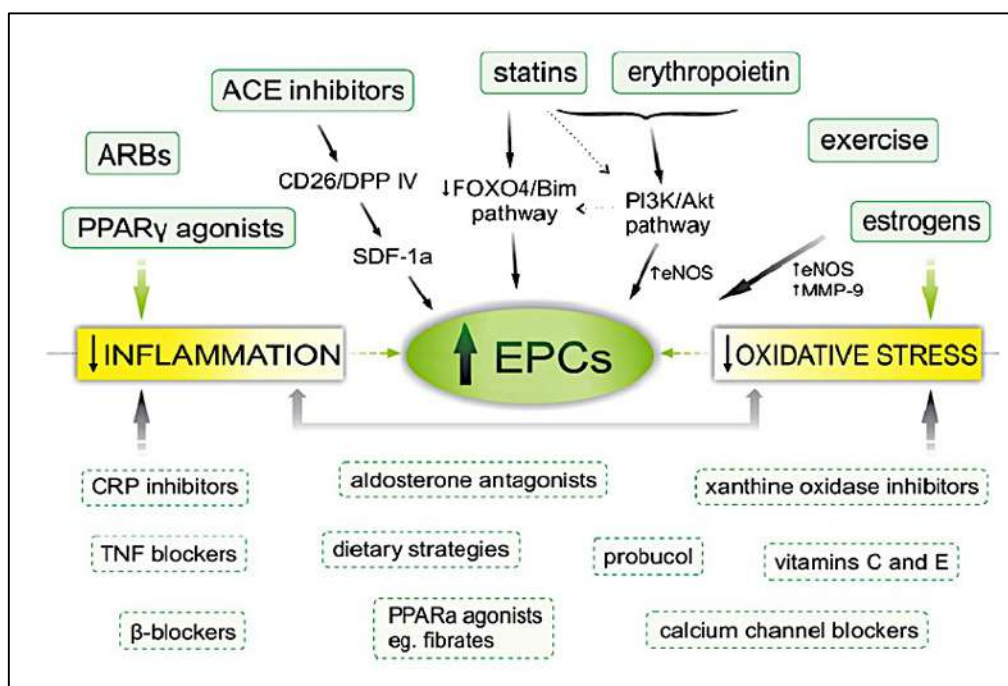
### **2.2.2 Peran Antioksidan pada PJK**

Antioksidan adalah senyawa pemberi elektron (*electrone donor*), yang dapat meredam dampak negatif dari oksidan dalam tubuh. Antioksidan bekerja pada tubuh dengan mencegah terhipernya senyawa oksidan secara berlebihan dan mencegah terjadinya reaksi rantai yang berkelanjutan. Secara umum antioksidan

dikelompokkan menjadi antioksidan enzimatis dan non-enzimatis. Antioksidan enzimatis seperti superoksida dismutase (SOD), katalase dan glutathion peroksidase; sedangkan antioksidan non enzimatis dapat dibagi menjadi dua golongan yaitu yang larut air seperti asam askorbat, protein pengikat heme dan pengikat logam, sedangkan antioksidan yang larut lemak seperti a-tokoferol, karotenoid, flavonoid, quinon dan bilirubin.

Pada pembuluh darah, proteksi terhadap stres oksidatif dicapai melalui kombinasi berbagai antioksidan endogen, yang memberikan efek protektif seluler dengan *scavenging* ROS secara langsung dan mengurangi kerusakan yang ditimbulkan. Antioksidan yang diyakini dapat melindungi endotel adalah SOD. Peran SOD adalah menguraikan ion superoksid menjadi molekul tidak reaktif, sehingga NO menjadi lebih stabil dan sintesis NO dapat ditingkatkan. EPC memiliki ekspresi enzim antioksidan endogen yang tinggi sehingga EPC cenderung resisten terhadap stress. Namun, paparan faktor risiko kardiovaskuler dapat mengubah status redoks EPC dan menimbulkan stres oksidatif (Lin *et al.*, 2013). Jika terjadi suatu stres oksidatif akibat antioksidan endogen tidak dapat menangani pembentukan ROS yang eksepif, maka dibutuhkan antioksidan eksogen yang terbukti bermanfaat mencegah kerusakan sel akibat stres oksidatif. Antioksidan eksogen bekerja secara langsung maupun tidak langsung. Secara langsung antioksidan mendonorkan ion hidrogen sehingga dapat menetralkan efek toksik dari radikal bebas. Secara tidak langsung, antioksidan eksogen meningkatkan ekspresi gen antioksidan endogen melalui beberapa mekanisme, salah satunya adalah aktivasi *nuclear factor erythroid 2 related factor* (Nrf2) sehingga terjadi peningkatan gen yang berperan dalam sintesis enzim antioksidan endogen.

Peningkatan ekspresi Nrf2 juga dapat menekan ekspresi *redox-sensitive inflammatory gene*.



**Gambar 2.7** Intervensi terapeutik untuk perbaikan fungsi dan kuantitas EPC dengan target proses inflamasi dan stres oksidatif. Bagian atas dari bagan menunjukkan terapi yang telah diteliti secara luas dan diketahui mekanismenya. Bagian bawah dari bagan menunjukkan terapi yang memiliki potensi menguntungkan dan perlu dievaluasi dengan studi lebih lanjut (Tousoulis *et al.*, 2008).

Bahan makanan dari tanaman tertentu diduga dapat mencegah stres oksidatif sehingga dapat mencegah aterosklerosis melalui hambatan inflamasi pada endotel pembuluh darah. Penelitian *in vitro* dan *in vivo* membuktikan bahwa komponen aktif (*nutraceuticals*) tertentu dari tumbuh-tumbuhan memiliki efek antioksidan dan antiinflamasi yang sebagian mekanismenya belum diketahui. *Nutraceuticals* yang telah diteliti dan terbukti bermanfaat terhadap kesehatan antara lain flavonoid, sterol, karotinoid, glukosinolat, asam lemak omega-3 serta pre- dan probiotik (Herring dan Albrecht, 2005).

Flavonoid merupakan salah satu komponen *protective phytochemicals* yang memberikan warna, rasa serta bau pada buah dan sayur. Flavonoid adalah salah satu

gugus polifenol yang terbukti sebagai antioksidan, melindungi endotel pembuluh darah, antiinflamasi dan imunomodulator. Flavonoid dari sayur dan buah tertentu berfungsi sebagai antioksidan eksogen sehingga dapat mencegah kerusakan molekul makro akibat stres oksidatif. Saat ini dikenal ribuan jenis flavonoid, salah satunya adalah antosianin. Antosianin terdapat pada umbi ubijalar ungu dengan konsentrasi cukup tinggi. Antosianin umbi ubijalar ungu tersebut telah diteliti pada mencit, tikus dan kelinci sebagai antioksidan. Penelitian lain menemukan bahwa antosianin yang terdapat ubijalar ungu sebagai antioksidan *in vitro*. Ekstrak air umbi ubijalar ungu yang mengandung antosianin cukup tinggi (146 mg/ml) dapat menurunkan *malondialdehyde* (MDA) pada tikus dan kelinci (Jawi *et al.*, 2008; Jawi dan Budiasa, 2011).

Vitamin C (asam askorbat) dan vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol) mencegah terjadinya aterosklerosis melalui hambatan terhadap oksidasi LDL dan adhesi leukosit pada endotel. Secara umum, asam askorbat lebih efektif dibanding  $\alpha$ -tokoferol dalam proses patofisiologis tersebut, karena kemampuan asam askorbat yang dapat menetralkan berbagai radikal bebas serta dapat meregenerasi  $\alpha$ -tokoferol dari bentuk radikalnya.  $\alpha$ -tokoferol sendiri dapat bersifat sebagai antioksidan atau prooksidan untuk menghambat ataupun memfasilitasi proses oksidasi LDL. Sehingga dibanding vitamin E, vitamin C lebih diunggulkan dalam proteksi terhadap proses aterosklerosis. Vitamin C telah lama diketahui memiliki peran penting pada *vascular bed* yang menyokong sel endotel, yaitu meningkatkan sintesis dan deposisi kolagen tipe IV pada membran basal, menstimulasi proliferasi endotel, menghambat apoptosis, menetralkan radikal bebas dan meningkatkan produksi NO dari sel endotel (Carr *et al.*, 2000).

### 2.3 Ubijalar Ungu

Ubi jalar adalah salah satu bahan makanan yang banyak ditemukan di Indonesia. Ubi jalar (*Ipomoea batatas*) adalah tanaman dikotiledon, ordo *solanacea* yang masuk dalam family *convolvulaceae*. Ubi jalar ada yang berwarna putih, kuning, merah/jingga, dan ungu. Berbagai macam jenis dan varietas ubijalar ungu telah dikenal di dunia, di Bali terdapat tiga varietas yaitu MSU 01022-12, MSU 03028-10, RIS 03063-05 (Gambar 2.8). Ubijalar ungu merupakan sumber karbohidrat dan kalori yang cukup tinggi. Kandungan lainnya berupa protein, lemak, serat kasar, vitamin dan mineral (Suprpta *et al.*, 2004). Warna ungu pada umbi ubijalar ungu disebabkan oleh antosianin, senyawa yang memiliki khasiat antioksidan dua hingga tiga kali lebih tinggi dari beberapa varietas *blueberry*. Varietas MSU 03028-10 memiliki kadar antosianin 560 mg/100 g umbi, lebih tinggi dari ubi jalar ungu asal Jepang varietas *Ayamurasaki* dan *Yamagawamurasaki* (Jusuf *et al.*, 2011).



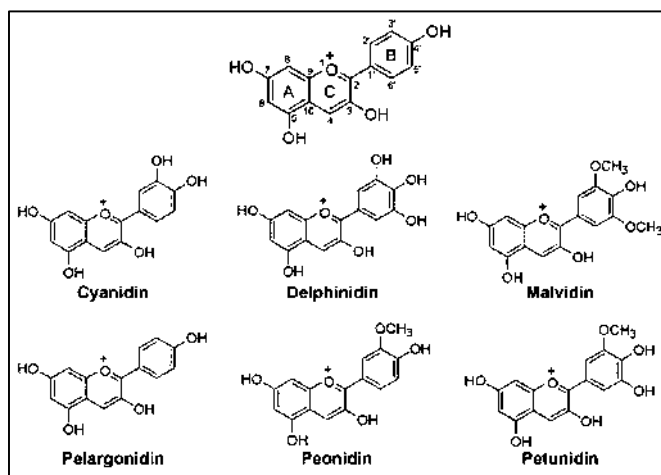
**Gambar 2.8** Umbi dan tanaman ubijalar ungu yang ditemukan di Bali.

Antosianin adalah suatu jenis polifenol grup flavonoid yang paling banyak ditemukan pada buah-buahan dan sayuran. Antosianin merupakan pigmen yang larut dalam air, dan memberi warna merah, ungu dan biru pada banyak buah-buahan, sayuran, bunga dan biji-bijian (Fuhrman dan Aviram, 2002). Pigmen ini

banyak terdapat pada makanan, antara lain buah-buahan seperti *blueberry*, *cranberry*, *billberry*, juga terdapat pada kulit terong ungu, beras merah, kulit anggur, serta terutama banyak terdapat pada ubi jalar ungu.

### 2.3.1 Struktur Kimia dan Bioavailabilitas Antosianin dari Ubijalar Ungu

Ada 6 jenis antosinidin yang ditemukan dalam tanaman, yang paling banyak terdapat pada tumbuh-tumbuhan adalah *cyanidin*, diikuti dengan *pelargonidin*, *peonidin*, *delphinidin*, *petunidin* dan *malvidin* (Shipp dan Abdel-Aal, 2010). Warna ungu pada ubi jalar ungu, disebabkan oleh akumulasi struktur *monoacylated* dan *diacylated 3-(2-glucosyl)glucosyl-5-glucosyl cyanidin* dan *3-(2-glucosyl)glucosyl-5-glucosyl peonidin* (Harada *et al.*, 2004; Montilla *et al.*, 2010). Perbedaan masing-masing antosianin terletak pada jumlah dan posisi grup hidroksil, tingkat metilasi grup hidroksil, nomor dan lokasi gula yang terikat pada molekul, serta asam alifatik atau aromatik yang menempel pada gula tersebut (Gambar 2.9).



**Gambar 2.9** Rumus bangun senyawa antosianin (Kim *et al.*, 2004)

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa selain bekerja sebagai antioksidan, antosianin juga mempunyai efek anti-inflamasi, efek anti-diabetik, anti-kanker, dan dapat memperbaiki profil lipid darah dan memiliki efek

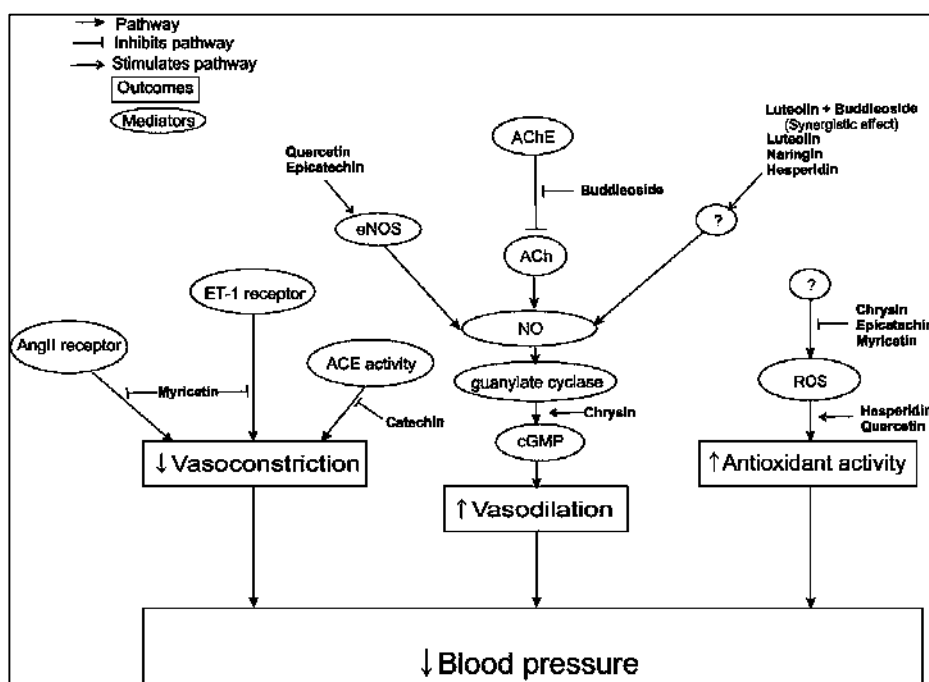
vasoprotektif (Wrolstad, 2001; Shipp dan Abdel-Aal, 2010). Struktur fenolik antosianin bertanggung jawab pada efek antioksidan melalui gugus hidroksil pada posisi 3 dari cincin C dan posisi 3', 4', 5' dari cincin B.

Antosianin diabsorpsi dalam bentuk glikosida yang intak, didistribusi pada sistem sirkulasi dan diekskresi di urine (Kano *et al.*, 2005; Shipp dan Abdel-Aal, 2010). Absorpsi antosianin terjadi segera setelah konsumsi, konsentrasi plasma maksimal pada manusia dicapai dalam 90 menit setelah dikonsumsi dan terdeteksi dalam urin setelah 15 jam. Jumlah antosianin yang diserap tergantung dari jenis antosianin yang dikonsumsi (Shipp dan Abdel-Aal, 2010). Ekskresi antosianin terjadi lengkap dalam waktu 6–8 jam. Kurang dari 0,1% antosianin yang dikonsumsi terdeteksi di urine, menimbulkan dugaan bahwa sebagian besar antosianin yang dikonsumsi diabsorpsi di saluran pencernaan, terutama di lambung dan usus halus, dan didistribusikan ke sistem sirkulasi (Shipp dan Abdel-Aal, 2010).

### **2.3.2 Efek Farmakologis Antosianin**

Efek antioksidan yang kuat dari antosianin telah banyak diteliti dan terbukti dapat mencegah timbulnya berbagai penyakit kronis seperti kanker, diabetes dan PJK. Antosianin bekerja sebagai antioksidan melalui beberapa cara, yaitu sebagai penangkap radikal bebas, membentuk kelat dengan logam, mengikat protein dan mekanisme lain yang belum diketahui (Gambar 2.10) (Wu *et al.*, 2002). Antosianin merupakan salah satu flavonoid yang dapat menangkap radikal bebas dengan kemampuan jauh lebih kuat dari vitamin E. Antosianin memiliki kemampuan yang berbeda dalam menangkap radikal bebas, perbedaan kemampuan tersebut ditentukan oleh rumus bangun masing-masing antosianin (Antal *et al.*, 2003).

Radikal bebas dapat dinetralkan oleh antosianin karena antosianin mendonorkan atom H dari fenolik hidrogen sehingga radikal bebas menjadi stabil. Antosianin sendiri akan menjadi radikal bebas namun jauh lebih stabil dibandingkan radikal bebas yang telah dinetralkan.



Gambar 2.10 Mekanisme kerja berbagai flavonoid pada sistem kardiovaskuler (Clark *et al.*, 2015).

Mekanisme kerja flavonoid mulanya diasumsikan terbatas pada kemampuan flavonoid untuk menangkap ROS atau melalui pengaruhnya terhadap status redoks intraseluler. Namun, karena konsentrasi flavonoid yang didapatkan sedikit *in vivo*, maka efek antioksidan flavonoid tidak tercapai melalui kompetisi terhadap antioksidan lain yang berada *in vivo* dalam konsentrasi yang lebih tinggi seperti asam askorbat. Berbagai studi menunjukkan bahwa efek seluler flavonoid dimediasi oleh interaksi flavonoid dengan beberapa protein spesifik yang berkaitan dengan kaskade *signalling* intraseluler seperti MAPK dan PI3K/Akt. Terdapat bukti yang mendukung peran flavonoid pada jalur ERK yang dimediasi oleh interaksinya



dengan MAPK kinase MEK1 dan MEK2 dan reseptor membran. Flavonoid memiliki struktur yang serupa modulator farmakologis spesifik dari *signaling* ERK seperti PD98059 (2-methoxyflavone). Flavonol jenis quercetin dan metabolitnya terbukti dapat menginduksi apoptosis neuron melalui mekanisme yang melibatkan inhibisi ERK, bukan melalui induksi *signaling* proapoptosis melalui JNK (Spencer, 2010).

Kano dkk (2004) menunjukkan bahwa antosianin yang berasal dari ubi ungu memiliki aktivitas *radical scavenging* yang paling tinggi dibanding pigmen antosianin yang berasal dari tumbuhan lain; dan pada urin tikus dan manusia yang mengkonsumsi ubijalar ungu didapatkan peningkatan aktivitas *radical scavenging* oleh *1,1-diphenil-2-picrylhydrazyl* (DPPH). Ubi jalar ungu memiliki aktivitas *oxygen radical absorbance capacity* (ORAC) sepuluh kali lipat lebih tinggi dibandingkan dengan ubi jalar putih, kuning dan oranye (Oki *et al.*, 2003). Efek radikal *scavenging* antosianin dari ubi ungu terhadap DPPH lebih kuat dibandingkan antosianin dari vitamin c, juga lebih kuat dari antosianin yang ditemukan pada kubis merah, kulit anggur, *elderberry*, dan jagung ungu. Selain itu antosianin dari ubi jalar ungu dapat menekan peningkatan SGOT – SGPT pada tikus yang mengalami gangguan hati yang diinduksi karbon tetra klorida, serta memiliki efek anti atherosclerosis karena bersifat resisten terhadap oksidasi LDL (Kano *et al.*, 2005). Penelitian lain menemukan bahwa pemberian sirup ubi jalar ungu yang mengandung antosianin sekitar 0,1 mg/hari pada mencit (20 g), dapat menekan peroksidasi lipid yang merupakan indikator tingkat kerusakan oksidatif sel/jaringan tubuh akibat radikal bebas, yang diukur dengan kadar MDA didalam darah (Jawi *et al.*, 2008). Pemberian ekstrak ubi jalar ungu dengan dosis 400mg antosianin/hari,

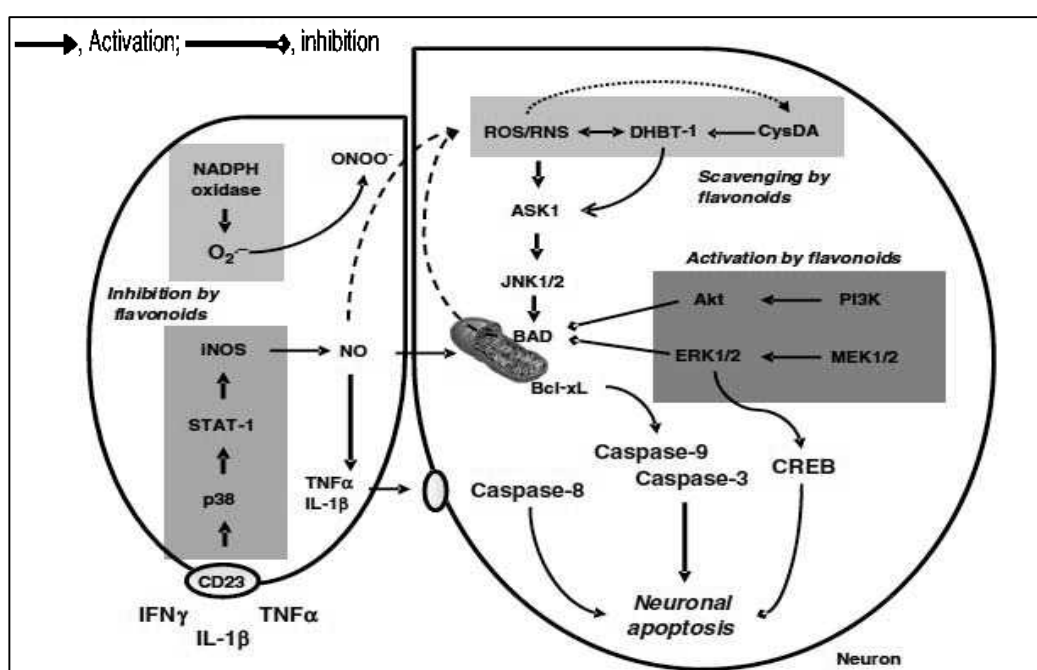
dapat meningkatkan kadar total antioksidan dan memperbaiki profil lipid darah kelinci (Jawi dan Budiasa, 2009). Penelitian pada manusia menunjukkan bahwa asupan minuman dari ubi jalar ungu yang mengandung antosianin 400 mg per hari mempunyai efek proteksi liver terhadap oksidatif stress (Suda *et al.*, 2003). Pemberian ekstrak ubi jalar ungu dengan dosis antosianin 2,7 mg/ 100 gr berat badan, dapat mengurangi cedera liver pada tikus ( Kano *et al.*, 2005).

Selain sifat *radical scavenging*, hepatoprotektif, antiaterosklerosis, dan antioksidan, antosianin juga memberikan efek farmakologis lain seperti menstabilkan kolagen, menjaga permeabilitas kapiler, antiinflamasi, menurunkan kadar gula darah, mempengaruhi metabolisme kolesterol sehingga akan menurunkan kadar kolesterol, antiagregasi trombosit, dan menimbulkan relaksasi otot polos pembuluh darah dengan meningkatkan produksi NO. Antosianin dari ubi jalar ungu juga dapat berfungsi sebagai antihipertensi seperti ACE *inhibitor* dan antihiperglikemik *in vivo* serta antimutagenik/antikarsinogenik (Suda *et al.*, 2003). Sedangkan mekanisme efek antosianin sebagai anti-inflamasi belum diketahui, namun suatu penelitian *in vitro* menunjukkan bahwa pemberian antosianin dapat menurunkan aktivasi faktor transkripsi NF-kB dan menurunkan ekspresi beberapa sitokin dan mediator proinflamasi (Karlsen *et al.*, 2007).

### **2.3.3 Efek Antosianin terhadap Sel Endotel dan EPC**

Pada pembuluh darah, antosianin menghambat proses aterosklerosis melalui beberapa cara. Antosianin bekerja sebagai antioksidan yang akan mencegah terjadinya oksidasi LDL. Penelitian yang dilakukan di Eropa pada 55 orang wanita menunjukkan bahwa pemberian antosianin mampu menurunkan kadar LDL yang teroksidasi dibandingkan dengan kontrol (Sterling, 2001). Pada sel, flavonoid

(antosianin) akan menangkap ROS dan menginduksi jalur *signaling pro-survival*, seperti jalur ERK 1/2 dan PI3K/Akt, yang kemudian menghambat apoptosis sel (Gambar 2.11). Aktivasi jalur tersebut oleh flavonoid selanjutnya akan mengaktifkan Nrf2 sehingga terjadi peningkatan enzim antioksidan endogen (Spencer, 2010). Selain berperan sebagai antioksidan, antosianin juga melindungi integritas endotel pembuluh darah sehingga tidak terpengaruh oleh keadaan iskemia yang akan merangsang terjadinya inflamasi dan stres oksidatif. Antosianin juga menjaga pembuluh darah dalam keadaan relaksasi.



**Gambar 2.11** Mekanisme seluler flavonoid dan metabolitnya dalam memproteksi sel terhadap inflamasi dan kerusakan oleh 5-S-cysteinyl-dopamine (CysDA), dihydrobenzothiasine (DHBT-1) dan ROS. STAT-1, *signal transducer and activator of transcription-1*; IFN-g, *interferon-g*; RNS, *reactive nitrogen species*; ASK1, *apoptosis signal-regulating kinase 1*; JNK, *c-Jun N-terminal kinase*; BAD, *Bcl-xL/Bcl-2 associated death promoter*; MEK1/2, *mitogen-activated protein kinase kinases*; CREB, *cAMP response element-binding protein* (Spencer, 2010).

Antosianin juga memiliki efek kardioprotektif melalui perannya sebagai antiinflamasi. Salah satu aktivator sel endotel yang mendasari proses aterosklerosis adalah jalur *signaling* inflamasi yang dimediasi CD40. Sel endotel yang diberikan

antosianin jenis *cyanidin-3-O-β-glucoside* dan *peonidin-3-O-β-glucoside* mencegah aktivasi sel endotel yang diinduksi CD40 dengan menghambat produksi sitokin proinflamasi dan *matrix metalloproteinases*. Efek antiinflamasi dari antosianin tercapai melalui pencegahan aktivasi jalur JNK dan p38 yang diinduksi CD40 yang kemudian akan menghambat aktivasi dan apoptosis sel endotel (Xia *et al.*, 2009).

Studi dari Sun dkk (2015) yang meneliti efek pemberian ubi ungu pada tikus dengan prediabetes menunjukkan bahwa antosianin berperan dalam *downregulation* dari akumulasi ROS dan fungsi inflamasi NLRP3 sehingga menghambat terjadinya *senescence* endotel yang prematur dan mencegah perburukan fungsi endotel yang dicetuskan D-galaktose. Hal ini menunjukkan bahwa pada disfungsi dan kematian sel endotel yang diinduksi diabetes, PSPC berperan penting melalui ROS dan jalur *signaling* NLRP3.

Ekstrak *chokeberry* terbukti dapat melindungi EPC dari disfungsi sel yang diakibatkan angiotensin-II dimana EPC yang diintervensi dengan ekstrak *chokeberry* sebelum pemaparan angiotensin-II menunjukkan peningkatan proliferasi dan aktivitas telomerase yang signifikan, dan penurunan persentase kematian sel dan pembentukan ROS intraseluler dibandingkan sel yang dipaparkan dengan angiotensin-II tanpa mendapat ekstrak *chokeberry*. Ekstrak *chokeberry* juga meningkatkan fungsi EPC mencakup kemampuan migrasi, adhesi pada fibronektin dan potensi angiogenik EPC yang berbanding lurus dengan konsentrasi ekstrak. Efek ini dikaitkan dengan aktivasi faktor transkripsi Nrf2 dan ekspresi *heme oxygenase-1* (HO-1) (Parzonko *et al.*, 2015). Studi lain menunjukkan bahwa pinocembrin, flavonoid yang didapatkan pada propolis, dapat meningkatkan

proliferasi, migrasi, adhesi dan kapasitas vaskulogenik dari EPC, serta meningkatkan ekspresi eNOS dan pelepasan NO di sirkulasi melalui jalur PI3K/Akt/eNOS (Yang *et al.*, 2013). Diasumsikan antosianin yang berasal dari ubi ungu dapat meningkatkan jumlah EPC melalui peningkatan proliferasi maupun penurunan kematian sel yang akan dibuktikan dalam penelitian ini.

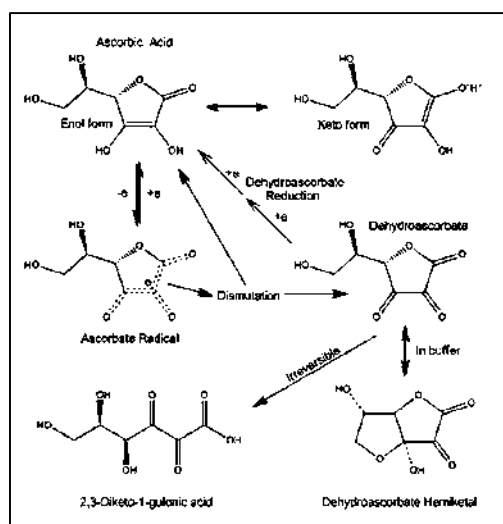
## 2.4 Vitamin C

### 2.4.1 Struktur Kimia dan Bioavailabilitas Vitamin C

Vitamin C (asam askorbat) merupakan lakton dengan enam karbon ( $C_6H_8O$ ) yang disintesa dari glukosa pada hepar seluruh mamalia, kecuali manusia, primata dan marmut. Manusia mengalami mutasi gen sehingga tidak memiliki enzim gulonolakton oksidase (GULO), enzim utama dalam jalur biosintesis vitamin C (Nishikimi, 1996). Sehingga, manusia harus mendapatkan asupan vitamin C dari luar untuk menghindari kondisi defisiensi, dimana defisiensi vitamin C yang berat dapat menimbulkan terjadinya *scurvy* dengan manifestasi pembuluh darah yang rapuh, kerusakan jaringan konektif, kelemahan dan kematian (Padayatti, 2003). Asam askorbat banyak didapatkan pada buah dan sayuran segar, seperti jeruk, lemon, anggur, pepaya, mangga, tomat, dan kol (Naidu, 2003).

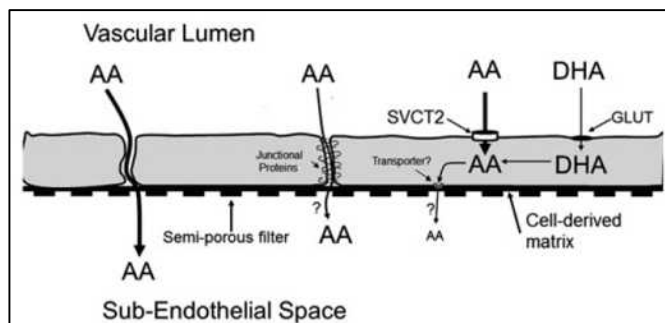
Pada makanan, vitamin C terutama didapatkan dalam bentuk asam L-askorbat dan asam dehidroaskorbat (Gambar 2.12). Bioavailabilitas dan kadar asam askorbat di serum ditentukan oleh absorpsi di usus dan eksresi di ginjal. Vitamin C yang didapat dari bahan makanan maupun suplemen akan diserap oleh sel epitel usus halus dan berdifusi menuju kapiler di sekitarnya kemudian masuk ke sistem sirkulasi (Hornig *et al.*, 1973). Pada ginjal, asam askorbat yang bersirkulasi disaring

dari kapiler glomerulus menuju kapsula Bowman melalui mekanisme penjarangan umum. Asam askorbat ketika melewati tubulus proksimal akan diserap kembali oleh pembuluh kapiler yang melingkupi tubulus ginjal melalui sel epitel ginjal (Takanaga *et al.*, 2004).



**Gambar 2.12 Metabolisme asam askorbat.** Askorbat mendonorkan satu elektron dan menjadi radikal askorbat, yang akan bereaksi dengan radikal askorbat lainnya membentuk molekul askorbat dan dehidroaskorbat (DHA) (May dan Harrison, 2013).

Pada konsentrasi rendah, vitamin C akan diserap di usus halus dan diserap kembali di tubulus ginjal (Nelson *et al.*, 1978). Namun pada konsentrasi tinggi, transporter asam askorbat mengalami saturasi dan *downregulation*, sehingga membatasi jumlah asam askorbat yang diserap. Sehingga didapatkan keterbatasan konsentrasi efektif maksimal vitamin C dari konsumsi per oral sebesar 200 mmol/L, dimana kadar fisiologis pada serum yang normal didapatkan sebesar 60-100 mmol/L (Levine *et al.*, 1996). Namun, kadar vitamin C pada sel darah yang bersirkulasi, seperti platelet, lebih tinggi daripada dalam plasma karena sel-sel ini mengekspresikan transporter SVCT2 yang memediasi akumulasi askorbat intraseluler (Gambar 2.13) (Tsukaguchi *et al.*, 1999). Rekomendasi jumlah asupan harian untuk asam askorbat adalah 90 mg/hari untuk laki-laki dan 75 mg/hari untuk wanita (Frei dan Taber, 2001).



**Gambar 2.13** Askorbat (AA) atau DHA yang ditambahkan pada sel endotel yang dikultur pada membran semi berpori memasuki sel melalui transporter SVCT2 atau GLUT (May dan Harrison, 2013).

#### 2.4.2 Peran Vitamin C sebagai Antioksidan pada Sistem Kardiovaskuler

Secara fisiologis dan biokimiawi, vitamin C bekerja sebagai donor elektron pada proses reduksi-oksidasi. Asam askorbat akan mendonorkan dua elektron dari ikatan ganda antara karbon kedua dan ketiga dari enam molekul karbon (Padayatti *et al.*, 2003). Vitamin C dianggap sebagai antioksidan, karena dengan mendonorkan elektronnya, vitamin C dapat mencegah bahan lain mengalami proses oksidasi. Setelah mendonorkan elektron, vitamin C sendiri mengalami oksidasi menjadi radikal askorbat. Namun jika dibandingkan dengan radikal bebas yang lain, radikal askorbat cenderung stabil dan tidak reaktif, sehingga lebih tidak berbahaya. Reduksi radikal bebas yang reaktif dengan membentuk radikal bebas yang tidak reaktif disebut *free radical scavenging* (Bielski *et al.*, 1975). Askorbat dapat mengurangi ROS yang terbentuk sehingga dapat mencegah terjadinya oksidasi lipid. Vitamin C juga bekerja sebagai ko-faktor untuk beberapa enzim hidrosilase dan monooksigenase yang berperan dalam sintesa kolagen, sintesa protein, sintesa karnitin, biosintesa norepinefrin dari dopamin dan modulasi metabolisme tirosin (Padayatti *et al.*, 2003).

Asupan buah dan sayur yang tinggi dapat mengurangi risiko penyakit kardiovaskuler (Balady *et al.*, 2007). Hubungan ini sebagian besar didapatkan dari kandungan vitamin C dan E sebagai antioksidan yang terkandung dalam makanan. Berbagai studi epidemiologis, termasuk studi observasional dan RCT, telah menilai hubungan antioksidan dan kejadian PJK. Namun hasil dari studi ini tidak konsisten antara satu dengan yang lain. Walaupun studi eksperimental dan observasional menunjukkan adanya hubungan antara asupan vitamin C dengan risiko PJK yang lebih rendah (Shihabi *et al.*, 2002), namun sebagian besar RCT tidak dapat menunjukkan keuntungan vitamin C dalam pencegahan penyakit kardiovaskuler dan tidak merekomendasikan penggunaan vitamin C secara rutin (Ye *et al.*, 2013).

Namun studi *in vitro* menunjukkan bahwa pada konsentrasi fisiologis, asam askorbat menghambat proses oksidasi LDL oleh neutrofil dan sel vaskuler sehingga mencegah terbentuknya plak aterosklerotik (Martin dan Frei, 2007). Askorbat mencegah oksidasi LDL melalui proses *scavenging* radikal bebas dan ROS pada *aqueous milieu* (Frei dan Ames, 1989), dimana askorbat mencegah spesies reaktif tersebut berinteraksi dan mengoksidasi LDL. Radikal askorbil yang terbentuk pada proses ini dapat direduksi kembali menjadi askorbat dengan dismutasi, reduksi kimiawi (oleh glutathione), atau reduksi enzimatis. Askorbat juga dapat mencegah aktivitas prooksidasi  $\alpha$ -tokoferol dengan mereduksi radikal tokoferoksil menjadi  $\alpha$ -tokoferol, sehingga askorbat berperan sebagai koantioksidan dan menghambat oksidasi LDL (Li dan Herb, 2007). Vitamin C juga menghambat aterosklerosis melalui sintesis kolagen di pembuluh darah arteri dan mencegah adhesi leukosit pada pembuluh darah yang rusak (Barrita dan Sanchez, 2013). Studi *in vivo* menunjukkan bahwa



asam askorbat menghambat interaksi sel endotel dan leukosit yang diinduksi oleh asap rokok atau LDL teroksidasi (Lehr *et al.*, 1994; Lehr *et al.*, 1995).

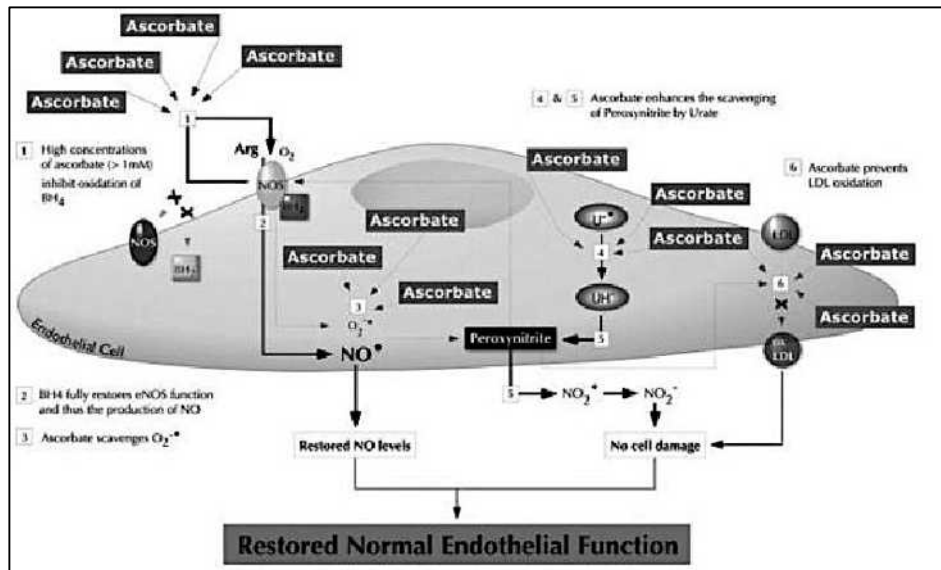
Peningkatan stres oksidatif merupakan salah satu mekanisme yang bertanggungjawab terhadap gangguan perfusi miokard setelah *percutaneous coronary intervention* (PCI) (Iuliano 2001). Studi oleh Wang dkk menunjukkan bahwa infus vitamin C intravena dapat mengurangi kerusakan miokard paska PCI, yang dapat disebabkan inhibisi terhadap stres oksidatif, pada 532 pasien dengan lesi baru yang menjalani PCI elektif (Wang *et al.*, 2014). Studi ini sesuai dengan data sebelumnya dari Basili dkk (2010) yang menunjukkan bahwa gangguan reperfusi mikrosirkulasi membaik setelah pemberian infus vitamin C pada pasien yang menjalani PCI elektif, yang dinilai dengan *Thrombolysis In Myocardial Infarction* (TIMI) *frame count* and tingkat perfusi miokard.

Berbagai studi klinis menunjukkan bahwa vitamin C bekerja sebagai pertahanan antioksidan lini pertama dalam plasma, sehingga dapat menghambat oksidasi LDL (Frei *et al.*, 1989). Saat ini juga didapatkan bukti pentingnya peranan vitamin C dalam mempertahankan fungsi endotel yang normal dan menghambat agregasi platelet dan mikroembolisasi, dengan meningkatkan bioavailabilitas NO melalui penurunan produksi peroksinitrit atau peningkatan aktivitas NO sintase (d'Uscio *et al.*, 2003). Selain itu, vitamin C juga mengurangi kerusakan jantung yang dipicu stres dengan *downregulation* katekolamin dan *tumor necrosis factor* (TNF) (Kim, 2013). Namun hingga saat ini efikasi dari terapi antioksidan masih belum dapat dinilai dengan baik karena kurang tersedianya metode kuantifikasi ROS dan NO pada dinding pembuluh darah secara *in vivo*.

### 2.4.3 Efek Vitamin C terhadap Fungsi Sel Endotel

Asam askorbat terbukti meningkatkan diferensiasi sel punca embriogenik pada berbagai studi. Studi oleh Cao dkk (2012) berhasil menunjukkan bahwa sintesis kolagen oleh asam askorbat meningkatkan diferensiasi sel punca pluripoten menjadi kardiomyosit secara spesifik melalui peningkatan proliferasi sel progenitor jantung melalui jalur MEK-ERK1/2. Askorbat dapat menstimulasi proliferasi sel endotel melalui peningkatan sintesis kolagen tipe IV, dimana kolagen tipe IV dibutuhkan dalam pembentukan membran basal (Mercier dan Ekindjian, 1990) dan adhesi sel endotel (Rixen *et al.*, 1989), yang tidak dimediasi oleh kolagen tipe I dan III. Defisiensi asam askorbat akan mencegah terbentuknya kolagen tipe IV yang matur oleh sel endotel (Yoshikawa *et al.*, 2001). Rendahnya kolagen tipe IV berkaitan dengan penurunan jumlah maupun fungsi sel endotel akibat menurunnya proliferasi atau meningkatnya apoptosis (Aguirre dan May, 2008). Apoptosis pada sel endotel dapat dipicu oleh berbagai faktor, seperti hiperglikemia, LDL teroksidasi, TNF- $\alpha$ , dan angiotensin II (Ho *et al.*, 2000; Recchioni *et al.*, 2002). Askorbat terbukti dapat mencegah apoptosis yang disebabkan sitokin inflamatorik dan LDL teroksidasi pada sel endotel yang dikultur (Recchioni *et al.*, 2002; Rossig *et al.*, 2001; Saeed *et al.*, 2003). Bukti *in vivo* juga menunjukkan penurunan konsentrasi mikropartikel apoptosis dari sel endotel pada pasien gagal jantung kongestif yang diberikan injeksi vitamin C intravena (Rössig *et al.*, 2001). Asam askorbat juga melindungi endotel vaskuler melalui pembentukan NO oleh *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS). NO berperan dalam relaksasi sel otot polos, vasodilatasi perifer, dan mencegah efek sitokin proinflamatorik dan molekul adhesi pada proses aterosklerosis (De Caterina *et al.*, 1995; Khan *et al.*, 1996;

Kubes *et al.*, 1991) (Gambar 2.14). Namun peran asam askorbat terhadap EPC hingga saat ini belum diketahui dengan pasti sehingga perlu diteliti lebih lanjut.

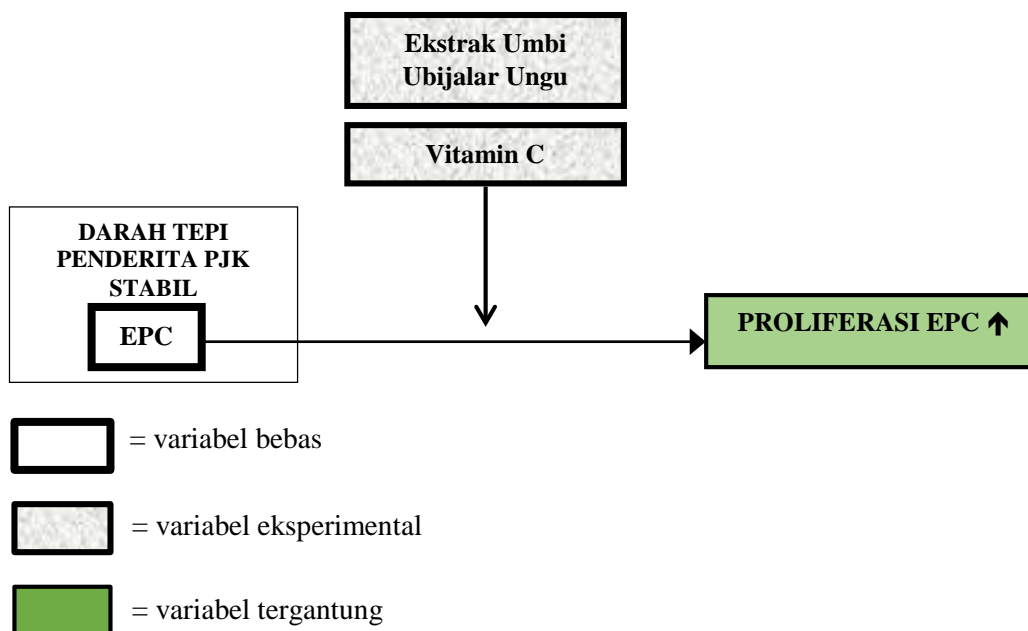


Gambar 2.14 Mekanisme kerja askorbat dalam proteksi kardiovaskuler terutama pada sel endotel (Trinidad *et al.*, 2013).

## BAB 3

### KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

#### 3.1 Kerangka Konseptual



**Gambar 3.1 Kerangka konseptual penelitian**

#### Keterangan kerangka konseptual

Patogenesis aterosklerosis diawali dengan kejadian disfungsi endotel yang salah satunya ditandai dengan rendahnya jumlah EPC. Penurunan jumlah EPC pada pasien PJK stabil dapat disebabkan oleh stress oksidatif yang dicetuskan oleh faktor risiko kardiovaskular. Pemberian antioksidan eksogen seperti antosianin dari ekstrak umbi ubijalar ungu dan vitamin C akan memberikan proteksi terhadap EPC dengan meningkatkan aktivitas antioksidan eksogen, menangkap radikal bebas, serta bekerja pada berbagai *signaling pathway* pada sel, sehingga akan menurunkan apoptosis sel dan meningkatkan proliferasinya. Hasil akhir dari pemberian antioksidan tersebut berupa peningkatan proliferasi EPC dan jumlah koloni yang terbentuk.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

“Terdapat peningkatan proliferasi EPC pada darah tepi penderita PJK stabil dengan pemberian ekstrak umbi ubijalar ungu (*Ipomoea batatas* L.) dosis rendah, sedang dan tinggi”.

“Terdapat peningkatan proliferasi EPC pada darah tepi penderita PJK stabil dengan pemberian vitamin C dosis rendah, sedang, dan tinggi”.

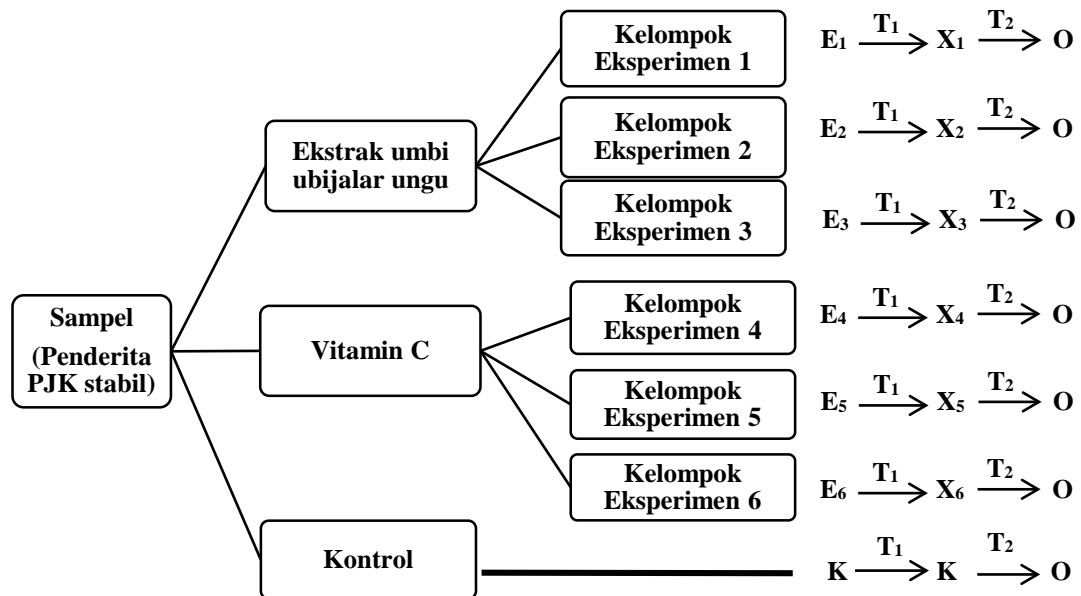
“Terdapat perbedaan peningkatan proliferasi EPC pada darah tepi penderita PJK stabil antara pemberian ekstrak umbi ubijalar ungu (*Ipomoea batatas* L.) dan vitamin C”.

## BAB 4

## METODE PENELITIAN

## 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental melalui uji laboratoris (*in vitro study*) dengan melakukan pemberian antioksidan berupa ekstrak umbi ubijalar ungu (*Ipomoea batatas L.*) dan vitamin C pada EPC yang berasal dari darah tepi penderita PJK stabil dengan pendekatan “*post test only control group design*”.



**Gambar 4.1** Desain Penelitian “*Post Test Only Control Group Design*”

**Keterangan gambar:** O: observasi, T: lama pengamatan, T<sub>1</sub>: 3 hari, T<sub>2</sub>: 2 hari, X<sub>1</sub>: pemberian ekstrak umbi ubijalar ungu dengan kadar antosianin 1 mcg/ml, X<sub>2</sub>: pemberian ekstrak umbi ubijalar ungu dengan kadar antosianin 5 mcg/ml, X<sub>3</sub>: pemberian ekstrak umbi ubijalar ungu dengan kadar antosianin 25 mcg/ml, X<sub>4</sub>: pemberian vitamin C dengan konsentrasi 10 mcg/ml, X<sub>5</sub>: pemberian vitamin C dengan konsentrasi 50 mcg/ml, X<sub>6</sub>: pemberian vitamin C dengan konsentrasi 250 mcg/ml, K: kontrol.

**Keterangan:**

Unit eksperimen yang digunakan pada penelitian ini adalah darah tepi penderita PJK stabil. Unit eksperimen dikelompokkan menjadi kelompok kontrol (K) yang tidak mendapat perlakuan, kelompok yang diberikan ekstrak ubi ungu

yang dibagi menjadi kelompok eksperimen 1 (E<sub>1</sub>), 2 (E<sub>2</sub>), dan 3 (E<sub>3</sub>), serta kelompok yang diberikan vitamin C yang dibagi menjadi kelompok eksperimen 4 (E<sub>4</sub>), 5 (E<sub>5</sub>), dan 6 (E<sub>6</sub>). Sel mononuklear diisolasi dari darah tepi sampel kemudian dibiakkan dalam media selama tiga hari. Perlakuan diberikan pada hari keempat berupa penambahan ekstrak umbi ubijalar ungu atau vitamin C. Pengamatan terhadap respon sel pada seluruh kelompok eksperimen dilakukan dua hari setelah pemberian perlakuan. Penilaian mengenai perubahan proliferasi EPC menggunakan *MTT cell proliferation assay* dan kuantifikasi jumlah koloni EPC yang terbentuk.

#### **4.2 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian laboratoris yang dilakukan di laboratorium *stem cell Institute of Tropical Disease* Universitas Airlangga di Surabaya. Penelitian ini dilaksanakan selama enam bulan (Februari 2016 – Juli 2016).

#### **4.3 Sampel Penelitian**

Sampel penelitian ini adalah EPC darah tepi yang diisolasi dari penderita PJK stabil yang diambil secara *purposive sampling* yaitu setiap penderita yang memenuhi kriteria penelitian dimasukkan dalam subyek penelitian sampai memenuhi jumlah besar sampel yang ditentukan.

##### **4.3.1 Kriteria Inklusi dan Eksklusi**

Penderita PJK stabil yang dimaksud merupakan pasien IDIK RSUD Dr. Soetomo Surabaya yang memenuhi kriteria penelitian berikut ini:

Kriteria inklusi:

- a. Laki-laki

- b. Umur : 40-59 tahun
- c. Penderita angina pektoris stabil
- d. Hasil angiografi koroner menunjukkan lesi dengan stenosis signifikan >50% pada *left main coronary artery* (LMCA) atau >70% pada arteri koroner lainnya berdasarkan angiogram
- e. Bersedia mengikuti prosedur penelitian dan menandatangani *informed consent*

Kriteria eksklusi:

- a. Riwayat pemasangan *stent*
- b. Infark miokard akut
- c. Diabetes mellitus
- d. Merokok
- e. Iskemia tungkai akut
- f. Riwayat CABG
- g. Anemia

#### 4.3.2 Penghitungan Besar Sampel

Rumus besar sampel atau replikasi yang digunakan adalah (Sudigdo, 2008):

$$n_1 = n_2 \geq \frac{(Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta})^2 S^2}{(X_1 - X_2)^2}$$

n = besar sampel atau replikasi

$Z_{\alpha}$  = tingkat kesalahan tipe 1

$Z_{\beta}$  = tingkat kesalahan tipe 2

$X_1 - X_2$  atau  $\delta$  = perbedaan rerata minimal yang dianggap bermakna



S = simpang baku atau standar deviasi

Setelah dilakukan penghitungan dengan menggunakan tingkat kesalahan tipe 1 sebesar 5% ( $Z_{1-\alpha/2} = 1,96$ ), kesalahan tipe 2 sebesar 20% ( $Z_{1-\beta} = 0,84$ ), perbedaan rerata minimal yang dianggap bermakna sebesar 3,28 dan simpang baku sebesar 2,8 (Xu, et al., 2008), maka didapatkan  $n_1 = n_2 \geq 6$ . Untuk mengantisipasi kemungkinan kerusakan pada unit eksperimen, maka dilakukan koreksi sebesar 20% terhadap besar sampel pada penghitungan semula.

$$n = \frac{n}{(1 - f)}$$

n = besar sampel dari perhitungan semula

f = perkiraan proporsi kerusakan unit eksperimen

Berdasarkan perhitungan tersebut, besar sampel atau replikasi yang akan digunakan pada penelitian ini adalah 8.

#### 4.4 Variabel Penelitian

##### 4.4.1 Variabel Bebas

- EPC

##### 4.4.2 Variabel Eksperimental

1. Ekstrak umbi ubijalar ungu (*Ipomoea batatas* L.)
2. Vitamin C

##### 4.4.2 Variabel Tergantung

- Proliferasi EPC.

#### 4.5 Definisi Operasional

1. EPC : EPC merupakan bagian dari sel berinti tunggal atau MNC yang diperoleh dari isolasi darah tepi dan kemudian dikultur dalam medium CFU, dengan penanda sel punca hematopoietik (CD34).

Satuan : sel

Skala : rasio

2. Proliferasi EPC : Pembiakan atau bertambahnya jumlah EPC dari bentuk yang sama yang diperiksa dengan MTT *cell proliferation assay*.

Satuan : optical density (OD)

Skala data : rasio

2. Ekstrak umbi ubijalar ungu (*Ipomoea batatas* L.) : ekstrak yang didapat dari hasil perasan umbi ubi jalar ungu yang telah siap dipanen dan didapat dari perkebunan petani di Marga, Tabanan. Prosedur pembuatan ekstrak: umbi ubijalar ungu yang didapat dari petani dicuci dengan air bersih kemudian dikupas kulitnya. Setelah dikupas ubi jalar ungu kemudian dipotong melintang setebal 2-2,5 cm. Potongan ubi jalar ungu tersebut dicampur dengan air bersih menggunakan perbandingan 1 kg ubi jalar ungu ditambah air 1 liter lalu diblender dan disaring dengan tiga lapis kain kasa. Cairan yang diperoleh dari penyaringan tersebut dipanaskan hingga mendidih selama 30 menit untuk sterilisasi. Kandungan antosianin dari bahan ini adalah 146 mg/ml (Jawi, 2014). Pada penelitian ini akan digunakan ekstrak umbi ubijalar ungu dengan konsentrasi antosianin sebesar 1 mcg/ml, 5 mcg/ml, dan 25 mcg/ml.

Satuan : mcg/ml

Skala data : interval

3. Vitamin C : Asam L-askorbat yang digunakan untuk bahan penelitian laboratoris pada kultur sel (Sigma Aldrich, USA). Dosis vitamin C yang akan digunakan pada penelitian ini adalah 10 mcg/ml, 50 mcg/ml dan 250 mcg/ml.

Satuan : mcg/ml

Skala data : interval

#### 4.6 Bahan dan Alat Penelitian

Bahan dan alat yang diperlukan dalam penelitian ini adalah:

1. Sampel darah tepi @ 40 ml dalam tabung EDTA
2. Bahan dan alat untuk isolasi dan kultur EPC:
  - a. *Phosphate buffered saline* (PBS) dengan *fetal bovine serum* (FBS) 2%
  - b. Ficoll Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich, USA)
  - c. CFU-Hill *Liquid Medium Kit* (Stemcell Technologies, Canada)
  - d. *Trypan blue*
  - e. Tabung *conical* 50 ml
  - f. Inkubator dengan suhu 37°C dan kandungan CO<sub>2</sub> 5%
  - g. *Micropipette tip*
  - h. *Cylinder pipette*
  - i. *Fibronectin coated 24-wells plate*
  - j. *Fibronectin coated 96-wells plate*
  - k. Mesin sentrifugasi OneMed model 0512-1
  - l. Hemositometer
3. Bahan dan alat untuk mengukur proliferasi EPC:
  - a. *MTT Cell Proliferation Assay Kit* (Sigma-Aldrich, USA)

- b. Pembaca *microplate* pada panjang gelombang 595 nm
- 4. Bahan dan alat untuk menghitung jumlah koloni:
  - a. *Inverted light microscope*
  - 5. *Anti-human CD34 antibody clone 581* berlabel FIT-C (Biolegend®, USA)
  - 6. Ekstrak umbi ubijalar ungu
  - 7. Vitamin C / asam askorbat (Sigma-Aldrich, USA)
  - 8. Kuesioner klinis dan demografis

## 4.7 Prosedur Penelitian

### 4.7.1 Koleksi Sampel

Setelah menandatangani *informed consent*, sampel darah tepi diambil dari subyek relawan yang direkrut dengan kriteria inklusi sebagai berikut: menunjukkan gejala angina pectoris stabil, berjenis kelamin laki-laki, berusia 40-59 tahun, dan memiliki lesi stenosis >50% pada LMCA atau >70% pada arteri koroner lain berdasarkan angiogram. Subyek dengan riwayat pemasangan *stent*, infark miokard akut, diabetes mellitus, merokok, iskemia tungkai akut, riwayat CABG atau anemia dieksklusi dari kriteria subyek penelitian.

### 4.7.2 Isolasi Sel Darah Tepi dan Kultur EPC

Berikut ini adalah penjelasan langkah kerja isolasi MNC dari darah tepi dan kultur EPC:

1. Sampel darah tepi sebanyak 40 ml diambil dari *sheath* yang terpasang pada arteri femoralis durante angiografi koroner.
2. Distribusi masing-masing 20 ml darah ke dalam tabung conical 50 ml. Lakukan pengenceran dengan PBS + 2% FBS dengan perbandingan

darah : pengencer adalah 1:1 dan kemudian dicampur sehingga menjadi homogen.

3. Distribusikan 20 ml ficoll histopaque-1077 ke tabung *conical* 50 cc baru.
4. Teteskan perlahan-lahan 20 ml campuran darah + PBS dengan 2% FBS, ke tabung berisi ficoll histopaque-1007 melalui dinding tabung.
5. Sentrifugasi pada 800 g x 30'.
6. Ambil lapisan awan (PBMNC) yang terbentuk dari hasil sentrifugasi untuk selanjutnya dipisahkan dalam tabung baru.
7. PBMNC dicuci dengan PBS+2% FBS (1:1) dan disentrifugasi pada 300 g x 10'.
8. Buang supernatan. Pelet ditambahkan dengan PBS + FBS 2% secukupnya dan disentrifugasi kembali pada 300 g x 10'. Proses ini diulang dua kali.
9. Buang supernatan. Pelet dilarutkan dengan medium basal+suplemen CFU-Hill *Liquid Medium Kit* ± 10 ml.
10. Lakukan perhitungan sel dengan hemasitometer.
11. Sel dikonsentrasikan sehingga mencapai  $5 \times 10^6$  sel/ml.
12. Tambahkan sebanyak 1 ml suspensi sel ke dalam masing-masing sumur pada *fibronectin coated 6-well plate*.
13. Inkubasi pada suhu 37°C dan kandungan CO<sub>2</sub> 5% selama 48 jam.
14. Setelah 48 jam, pisahkan cairan yang berisi *non-adherent cell* dari *adherent cell* yang menempel pada dasar *plate*. Cairan yang akan digunakan adalah cairan berisi *non adherent cell*.

15. Kumpulkan seluruh cairan (yang berisi *non-adherent cell*) dari seluruh sumur hasil inkubasi ke 1 tabung.
16. Sentrifugasi pada 300 g x 7'. Buang Supernatan.
17. Pelet dilarutkan dengan medium basal+suplemen dengan konsentrasi  $1 \times 10^6$  sel/ml.
18. Pisahkan sel sesuai assay. Suspensi sel dibagi ke dalam *fibronectin coated 96-well plate* untuk MTT *cell proliferation assay* dan ke dalam *fibronectin coated 24-well plate* untuk penghitungan koloni yang terbentuk. Inkubasi selama 24 jam.
19. Setelah inkubasi selama 24 jam, diberikan perlakuan berupa penambahan ekstrak umbi ubijalar ungu atau vitamin C dengan dosis yang berbeda. Kelompok kontrol tidak ditambahkan perlakuan. Inkubasi kembali selama 48 jam.
20. Setelah inkubasi selama 48 jam, dilakukan pemeriksaan proliferasi EPC, ekspresi CD34 dan penghitungan jumlah CFU yang terbentuk.

#### **4.7.3 Pemeriksaan untuk Menilai Proliferasi EPC**

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) *Cell Proliferation Assay Kit* digunakan dalam pemeriksaan proliferasi sel. Pemeriksaan ini bekerja berdasarkan reduksi ekstraseluler MTT oleh *nicotinamide adenine dinucleotide* (NADH) yang diproduksi dalam mitokondria melalui *transplasma membrane electron transport* dan suatu mediator elektron. Reagen MTT ditambahkan pada setiap sumur dan diinkubasi dalam inkubator bersuhu 37°C dengan kandungan CO<sub>2</sub> 5% selama 4 jam. Absorbansi diukur dengan menggunakan pembaca *microplate* pada panjang gelombang 595 nm.

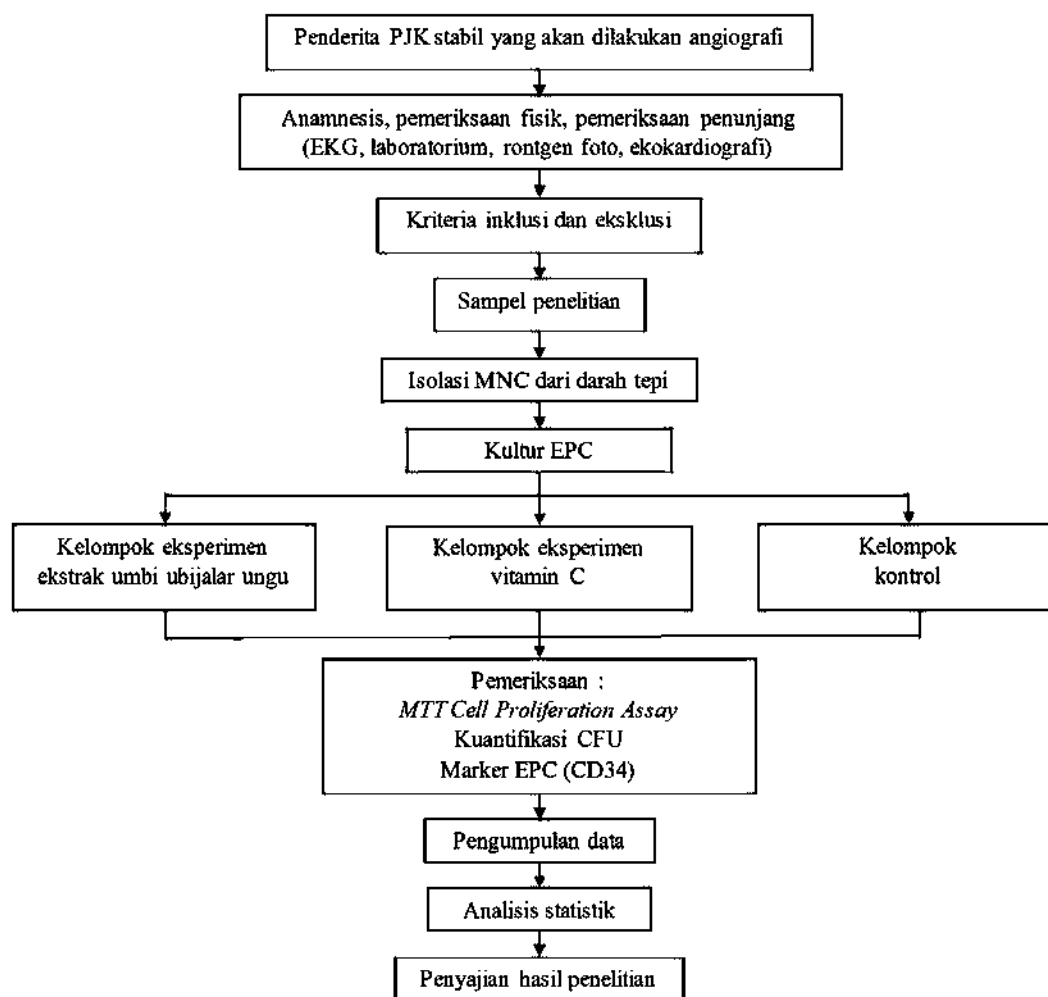
#### 4.7.4 Pemeriksaan untuk Menghitung Jumlah CFU EPC

Penghitungan koloni dilakukan pada masing-masing satu kelompok eksperimen ekstrak umbi ubijalar ungu dosis rendah dan tinggi, kelompok eksperimen vitamin C dosis rendah dan tinggi dan kelompok kontrol pada hari keenam. Koloni CFU-Hill yang terdapat pada sumur 24-well plate dihitung menggunakan *inverted light microscope*. CFU yang terbentuk setelah pemberian medium CFU-Hill merupakan gabungan  $\geq 15$  EPC yang berbentuk bulat, *spindle* atau *cobblestone*.

#### 4.7.5 Imunofluoresensi

Sel difiksasi dengan formaldehid 3% selama 15 menit pada suhu ruang kemudian dicuci dengan PBS sebanyak empat kali lalu dikeringkan. Untuk menghambat ikatan yang tidak spesifik, *bovine* serum albumin 0.1% juga ditambahkan dalam PBS, dilakukan *blocking* selama 15 menit pada suhu ruang. Sel dicuci kembali dengan PBS sebanyak empat kali lalu dikeringkan. Untuk uji antibodi, digunakan *anti-human CD34 antibody clone 581* yang sudah berlabel FIT-C. Inkubasi pada suhu 37°C selama 45 menit. Cuci kembali dengan PBS sebanyak empat kali, kemudian keringkan air di sekitar *object glass* dengan kertas tisu. Ekspresi sel didokumentasikan dengan memanfaatkan mikroskop fluoresensi, dikatakan positif jika sel tampak berpendar.

## 4.8 Alur Penelitian



Gambar 4.2 Alur penelitian

## 4.9 Pengumpulan dan Analisis Data

### 4.9.1 Pengumpulan Data

Data yang dikumpulkan pada penelitian ini adalah data primer yang berasal dari pengukuran proliferasi EPC pada kelompok eksperimen dan kontrol.

### 4.9.2 Analisis Data

Data deskriptif ditampilkan dalam bentuk rerata  $\pm$  standar deviasi (SD) atau median dan frekuensi. Hasil uji normalitas dengan uji *Kolmogorov Smirnoff* menunjukkan data yang berdistribusi normal. Kemudian dilakukan uji ANOVA



yang dilanjutkan dengan uji *Least Significant Difference* (LSD) karena didapatkan perbedaan yang signifikan. Nilai probabilitas  $<0.05$  dianggap memiliki nilai signifikan secara statistik. Data yang diperoleh kemudian di-*entry* dan diolah menggunakan *software* statistik berupa SPSS versi 20.0.

#### **4.10 Kelaikan Etik**

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan kelaikan etik dari komite etik penelitian kesehatan RSUD Dr. Soetomo Surabaya (No.292/Panke.KKE/IV/2016). Pasien dan keluarga telah diberikan penjelasan mengenai penelitian ini secara lisan dan secara tertulis berupa lembar penjelasan untuk mendapatkan persetujuan keikutsertaan sebagai subyek penelitian (*information for consent*). Pernyataan persetujuan keikutsertaan pasien dinyatakan dalam bentuk penandatanganan lembar *informed consent* oleh pasien atau keluarga pasien. Penderita atau keluarga penderita tidak dibebani biaya terkait penelitian ini. Data identitas dan hasil pemeriksaan pasien akan dirahasiakan dari pihak yang tidak berkepentingan.

## BAB 5

### HASIL PENELITIAN

#### 5.1 Karakteristik Dasar Subyek Penelitian

Pada penelitian ini digunakan 8 unit sampel darah yang berasal dari subyek dengan rerata usia  $54,5 \pm 4,31$  tahun (48-59 tahun), seluruhnya berjenis kelamin laki-laki, rerata masa indeks tubuhnya adalah  $25,39 \pm 2,3$  kg/m<sup>2</sup>, rerata tekanan darah sistolik (TDS)  $137,5 \pm 24,35$  mmHg (100-160 mmHg) dan rerata tekanan darah diastolik (TDD)  $80,0 \pm 7,56$  mmHg (70-90 mmHg), seluruh subyek mempunyai riwayat hipertensi dan dislipidemia dan mendapatkan pengobatan antihipertensi dan penurun kadar kolesterol (statin). Karakteristik subyek dapat dilihat pada Tabel 5.1.

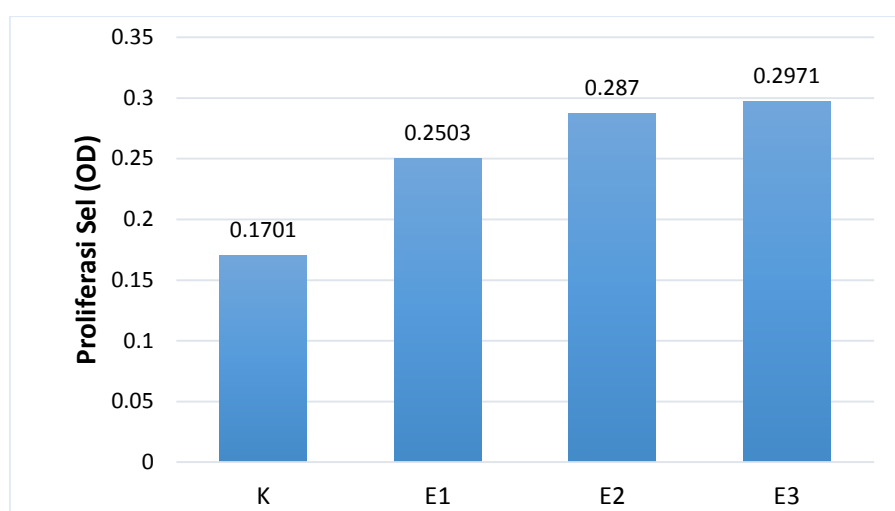
**Tabel 5.1. Karakteristik dasar subjek penelitian**

Variabel	Rerata $\pm$ SD
Usia (tahun)	$54,5 \pm 4,31$
Tinggi Badan (cm)	$168,0 \pm 1,3$
Berat Badan (kg)	$70,25 \pm 6,34$
Indeks Massa Tubuh (kg/m <sup>2</sup> )	$25,39 \pm 2,13$
TDS (mmHg)	$137,5 \pm 24,35$
TDD (mmHg)	$80,0 \pm 7,56$
Detak jantung (kali/menit)	$86 \pm 8,68$
Kolesterol total (mg/dl)	$200,5 \pm 74,75$
Trigliserida (mg/dl)	$97 \pm 11,64$
Kolesterol-LDL (mg/dl)	$145 \pm 61,11$
Kolesterol-HDL (mg/dl)	$35 \pm 7,64$
Fraksi ejeksi ventrikel kiri (%)	$53,5 \pm 4,11$

**Keterangan:** SD : *Standard Deviation*

## 5.2. Perbandingan Rerata Proliferasi EPC Kelompok Eksperimen Ekstrak Umbi Ubijalar Ungu Dosis Rendah, Sedang dan Tinggi dengan Kontrol

Pada penelitian ini ditemukan bahwa rerata proliferasi EPC pada kelompok kontrol (K), kelompok eksperimen ekstrak umbi ubijalar ungu dosis rendah ( $E_1$ ), kelompok eksperimen ekstrak umbi ubijalar ungu dosis sedang ( $E_2$ ), dan kelompok eksperimen ekstrak umbi ubijalar ungu dosis tinggi ( $E_3$ ) berturut-turut sebesar  $0,1701 \pm 0,0075$ ,  $0,2503 \pm 0,0053$ ,  $0,2870 \pm 0,0427$ , dan  $0,2971 \pm 0,0097$  (Gambar 5.1).



**Gambar 5.1 Rerata proliferasi EPC pada kelompok kontrol dan kelompok eksperimen ekstrak umbi ubijalar ungu dengan MTT *cell proliferation assay*.**

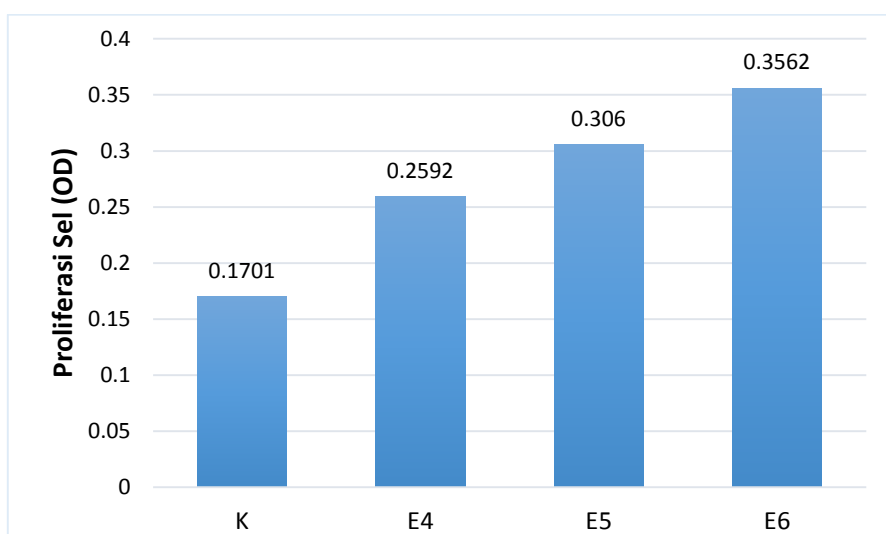
**Keterangan gambar:** K = kelompok EPC tanpa perlakuan (kontrol),  $E_1$  = kelompok EPC yang diberikan ekstrak umbi ubijalar ungu 1 mcg/ml,  $E_2$  = kelompok EPC yang diberikan ekstrak umbi ubijalar ungu sebesar 5 mcg/ml,  $E_3$  = kelompok EPC yang diberikan ekstrak umbi ubijalar ungu sebesar 25 mcg/ml. Hasil uji beda rerata antara setiap kelompok adalah: K vs.  $E_1$ ,  $p < 0,001$ . K vs.  $E_2$ ,  $p < 0,001$ . K vs.  $E_3$ ,  $p < 0,001$ .  $E_1$  vs.  $E_2$ ,  $p < 0,001$ .  $E_1$  vs.  $E_3$ ,  $p < 0,001$ .  $E_2$  vs.  $E_3$ ,  $p = 0,289$ . OD: *optical density*.

Secara keseluruhan, kelompok eksperimen ekstrak ubi ungu menunjukkan proliferasi EPC yang lebih tinggi secara bermakna dibandingkan kelompok kontrol ( $p < 0,001$ ). Peningkatan proliferasi EPC terjadi seiring dengan peningkatan dosis ekstrak umbi ubijalar ungu (*dose-dependent*). Peningkatan proliferasi yang bermakna terjadi antara kelompok eksperimen ekstrak umbi ubijalar ungu dosis

rendah dengan dosis sedang ( $p < 0,001$ ) dan dosis tinggi ( $p < 0,001$ ). Namun, antara kelompok eksperimen ekstrak umbi ubijalar ungu dosis sedang dan dosis tinggi walaupun secara mutlak meningkat, namun secara statistik tidak ditemukan perbedaan yang bermakna ( $p = 0,289$ ) (Gambar 5.1).

### 5.3 Perbandingan Rerata Proliferasi EPC Kelompok Eksperimen Vitamin C Dosis Rendah, Sedang dan Tinggi dengan Kontrol

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa rerata proliferasi EPC pada kelompok kontrol, kelompok eksperimen vitamin C dosis rendah ( $E_4$ ), kelompok eksperimen vitamin C dosis sedang ( $E_5$ ), dan kelompok eksperimen vitamin C dosis tinggi ( $E_6$ ) berturut-turut sebesar  $0,1701 \pm 0,0075$ ,  $0,2592 \pm 0,0165$ ,  $0,3060 \pm 0,0223$ , dan  $0,3562 \pm 0,023$  (Gambar 5.2).



**Gambar 5.2 Rerata proliferasi EPC pada kelompok kontrol dan kelompok eksperimen vitamin C dengan MTT *cell proliferation assay*.**

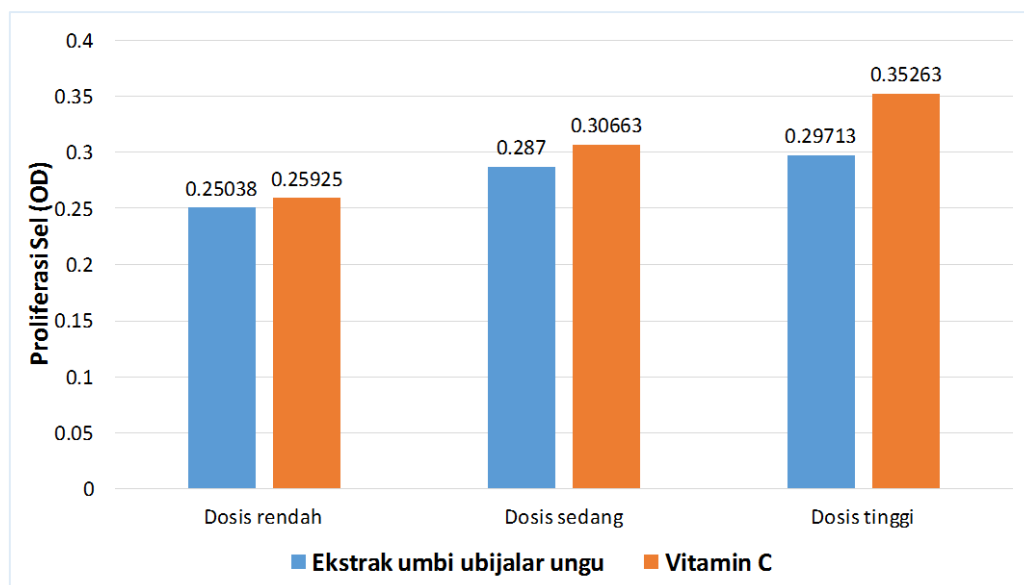
**Keterangan gambar:** K = kelompok EPC tanpa perlakuan (kontrol),  $E_4$  = kelompok EPC yang diberikan vitamin C 10 mcg/ml,  $E_5$  = kelompok EPC yang diberikan vitamin C sebesar 50 mcg/ml,  $E_6$  = kelompok EPC yang diberikan vitamin C sebesar 250 mcg/ml. Hasil uji beda rerata antara setiap kelompok adalah: K vs.  $E_4$ ,  $p < 0,001$ . K vs.  $E_5$ ,  $p < 0,001$ . K vs.  $E_6$ ,  $p < 0,001$ .  $E_4$  vs.  $E_5$ ,  $p < 0,001$ .  $E_4$  vs.  $E_6$ ,  $p < 0,001$ .  $E_5$  vs.  $E_6$ ,  $p < 0,001$ . OD: *optical density*.

Secara keseluruhan pemberian vitamin C (dosis rendah, sedang dan tinggi) meningkatkan proliferasi EPC lebih tinggi secara bermakna dibandingkan pada kelompok kontrol ( $p < 0.001$  untuk setiap kelompok *vs.* kontrol). Peningkatan proliferasi EPC terjadi seiring dengan peningkatan dosis vitamin C (*dose-dependent*). Peningkatan proliferasi yang bermakna juga terjadi pada kelompok eksperimen yang mendapat vitamin C dosis rendah dibanding dosis sedang ( $p < 0,001$ ) dan dosis tinggi ( $p < 0,001$ ), serta dosis sedang dibandingkan dosis tinggi ( $p < 0,001$ ) (Gambar 5.2).

#### **5.4 Perbandingan Rerata Proliferasi EPC antara Kelompok Eksperimen Ekstrak Umbi Ubijalar Ungu dengan Vitamin C Dosis Rendah, Sedang dan Tinggi**

Perbandingan rerata proliferasi EPC pada kelompok eksperimen ekstrak umbi ubijalar ungu dan vitamin C dosis rendah ( $E_1$  dan  $E_4$ ), kelompok eksperimen ekstrak umbi ubijalar ungu dan vitamin C dosis sedang ( $E_2$  dan  $E_5$ ), dan kelompok eksperimen ekstrak umbi ubijalar ungu dan vitamin C dosis tinggi ( $E_3$  dan  $E_6$ ) dapat dilihat pada Gambar 5.3.

Pemberian ekstrak umbi ubijalar ungu dosis rendah dan vitamin C dosis rendah ( $E_1$  dan  $E_4$ ) menunjukkan persamaan dalam hal peningkatan proliferasi EPC (0,25038 *vs.* 0,25925;  $p = 0,353$ ). Sedangkan pada dosis sedang dan tinggi, kelompok eksperimen vitamin C menunjukkan peningkatan proliferasi EPC yang lebih tinggi secara bermakna jika dibandingkan kelompok eksperimen ekstrak umbi ubijalar ungu (berturut-turut 0,28700 *vs.* 0,30663;  $p = 0,042$  dan 0,29713 *vs.* 0,35263;  $p < 0,001$ ).

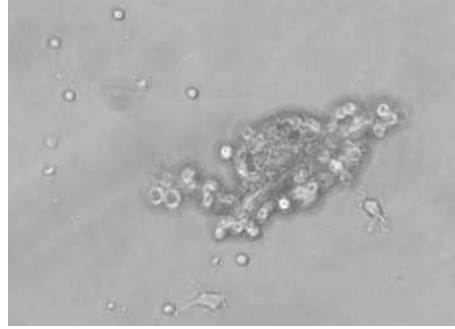


**Gambar 5.3** Perbandingan rerata proliferasi EPC pada kelompok eksperimen ekstrak umbi ubijalar ungu dan vitamin C dosis rendah ( $E_1$  dan  $E_4$ ), sedang ( $E_2$  dan  $E_5$ ) dan tinggi ( $E_3$  dan  $E_6$ ).

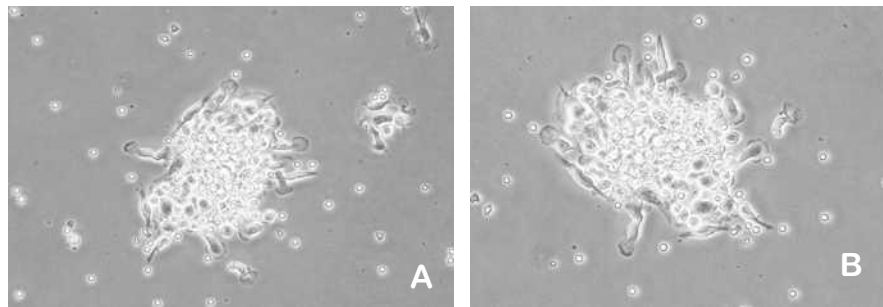
**Keterangan gambar:** kelompok eksperimen dosis rendah adalah kelompok EPC yang diberikan ekstrak umbi ubijalar ungu sebesar 1 mcg/ml ( $E_1$ ) dan vitamin C sebesar 10 mcg/ml ( $E_4$ ). Kelompok eksperimen dosis sedang adalah kelompok EPC yang diberikan ekstrak umbi ubijalar ungu sebesar 5 mcg/ml ( $E_2$ ) dan vitamin C sebesar 50 mcg/ml ( $E_5$ ). Kelompok eksperimen dosis tinggi adalah kelompok EPC yang diberikan ekstrak umbi ubijalar ungu sebesar 25 mcg/ml ( $E_3$ ) dan vitamin C sebesar 250 mcg/ml ( $E_6$ ). Hasil uji beda rerata antara setiap kelompok adalah:  $E_1$  vs.  $E_4$ ,  $p=0,353$ .  $E_2$  vs.  $E_5$ ,  $p=0,042$ .  $E_3$  vs.  $E_6$ ,  $p<0,001$ . OD: *optical density*.

### 5.5 Perbandingan Jumlah CFU EPC Kelompok Eksperimen Ekstrak Umbi Ubijalar Ungu, Vitamin C dan Kontrol

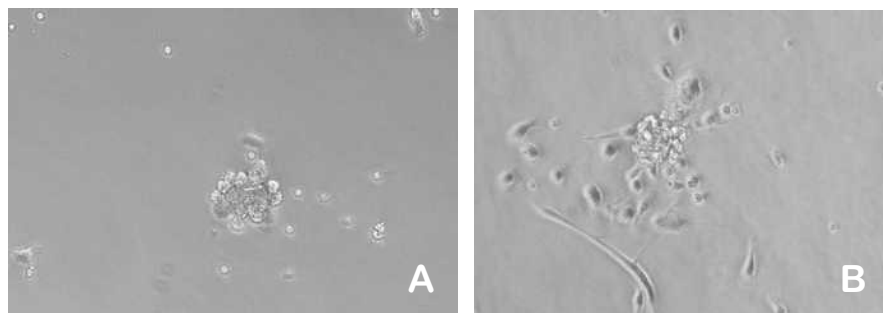
Pengamatan dan kuantifikasi CFU dilakukan untuk menilai fungsi EPC yang tumbuh. Gambar 5.4 memperlihatkan gambaran mikroskopis CFU kontrol, Gambar 5.5 memperlihatkan gambaran mikroskopis CFU kelompok eksperimen ubi ungu dengan dosis rendah dan tinggi, dan Gambar 5.6 menunjukkan gambaran mikroskopis CFU kelompok eksperimen vitamin C dengan dosis rendah dan tinggi.



**Gambar 5.4. CFU dari EPC kontrol pada pengamatan hari keenam.**



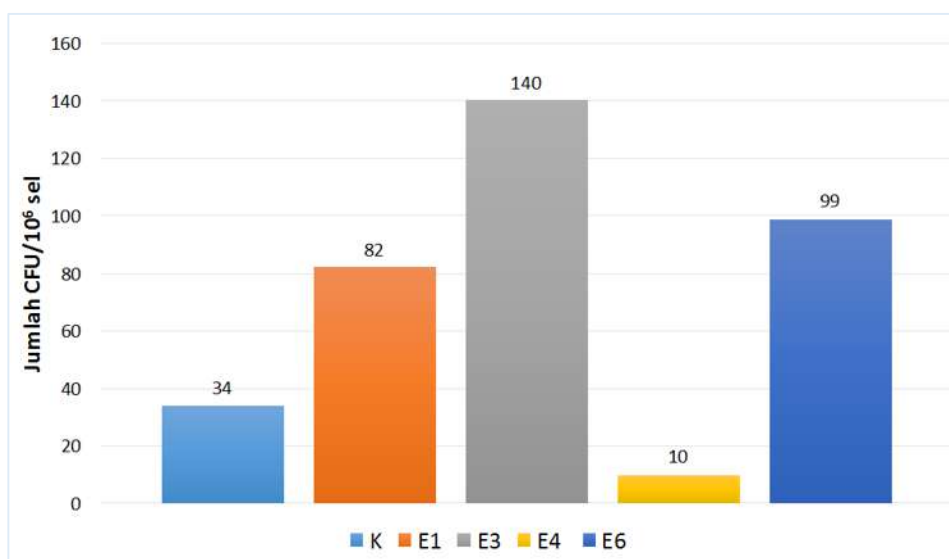
**Gambar 5.5. CFU dari EPC kelompok eksperimen ekstrak umbi ubijalar ungu dosis 1 mcg/ml (A) dan dosis 25 mcg/ml (B) pada hari keenam.**



**Gambar 5.6. CFU dari EPC kelompok eksperimen vitamin C dosis 10 mcg/ml (A) dan dosis 250 mcg/ml (B) pada hari keenam.**

Dari hasil penelitian ini ditemukan bahwa jumlah CFU/10<sup>6</sup> EPC pada kelompok EPC tanpa perlakuan (kontrol), kelompok EPC yang diberikan ekstrak umbi ubijalar ungu 1 mcg/ml (E<sub>1</sub>), kelompok EPC yang diberikan ekstrak umbi ubijalar ungu sebesar 25 mcg/ml (E<sub>3</sub>), kelompok EPC yang diberikan vitamin C 10 mcg/ml (E<sub>4</sub>), dan kelompok EPC yang diberikan vitamin C sebesar 250 mcg/ml (E<sub>6</sub>) pada pengamatan hari keenam berturut-turut sebanyak 34, 82, 140, 10, dan 99

koloni. Kelompok eksperimen ekstrak umbi ubijalar ungu dosis rendah ( $E_1$ ) dan dosis tinggi ( $E_3$ ) menghasilkan jumlah CFU yang lebih banyak dibandingkan kelompok kontrol (82 dan 140 vs. 34). Sedangkan jumlah CFU pada kelompok eksperimen vitamin C dosis rendah ( $E_4$ ) justru lebih sedikit dibanding kelompok kontrol (10 vs. 34), dengan jumlah yang lebih tinggi ditemukan pada kelompok eksperimen vitamin C dosis tinggi ( $E_6$ ) (99 vs. 34) (Gambar 5.7).



**Gambar 5.7.** Jumlah CFU pada kelompok kontrol, kelompok eksperimen ubi ungu dosis rendah dan dosis tinggi, dan kelompok eksperimen vitamin C dosis rendah dan dosis tinggi.

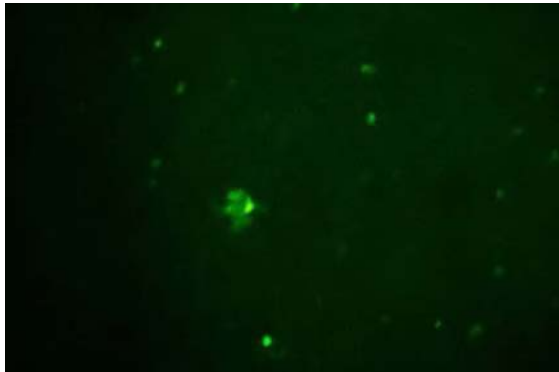
**Keterangan gambar:** K= kelompok EPC tanpa perlakuan (kontrol),  $E_1$ = kelompok EPC yang diberikan ekstrak umbi ubijalar ungu 1 mcg/ml,  $E_3$ = kelompok EPC yang diberikan ekstrak umbi ubijalar ungu sebesar 25 mcg/ml,  $E_4$ = kelompok EPC yang diberikan vitamin C 10 mcg/ml,  $E_6$ = kelompok EPC yang diberikan vitamin C sebesar 250 mcg/ml. CFU= *colony forming unit*.

## 5.6 Ekspresi Penanda EPC

Pengamatan marker EPC secara mikroskopis menggunakan metode immunofluoresen dilakukan untuk konfirmasi EPC. EPC sampel pada pengamatan hari keenam menunjukkan ekspresi CD34 dengan menggunakan fluorokrom Alexa



Fluor 488 (hijau) yang tampak pada Gambar 5.8. Hasil kultur EPC sampel terbukti merupakan EPC dengan ditandai oleh ekspresi CD34.



**Gambar 5.8. Ekspresi marker EPC pada pengamatan hari keenam.** Setelah EPC dikultur selama tiga hari, dilakukan fiksasi dan pengecatan secara imunofluoresen untuk mendeteksi ekspresi CD34 (Alexa fluor 488).

## BAB 6

### PEMBAHASAN

#### 6.1 Proliferasi EPC pada Pemberian Ekstrak Umbi Ubijalar Ungu

Pada penelitian ini ditemukan peningkatan proliferasi EPC darah tepi penderita PJK stabil yang bermakna pada pemberian ekstrak umbi ubijalar ungu dosis rendah (1 mcg/ml), sedang (5 mcg/ml), dan tinggi (25 mcg/ml) dibandingkan kontrol. Peningkatan proliferasi EPC ini terjadi secara *dose-dependent* dimana peningkatan dosis ekstrak umbi ubijalar ungu menyebabkan peningkatan proliferasi EPC yang lebih tinggi. Ekstrak umbi ubijalar ungu dosis sedang meningkatkan proliferasi EPC secara bermakna jika dibandingkan dosis rendah. Namun pada pemberian ekstrak umbi ubijalar ungu dosis sedang dan tinggi tidak didapatkan perbedaan peningkatan proliferasi yang bermakna. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak umbi ubijalar ungu dapat meningkatkan proliferasi EPC dengan dosis rendah, namun setelah melewati dosis sedang, peningkatan proliferasi EPC yang terjadi tidak berbeda jauh. Sehingga dapat disimpulkan bahwa untuk meningkatkan proliferasi EPC tidak dibutuhkan dosis yang tinggi dari ekstrak umbi ubijalar ungu. Dosis sedang pada penelitian ini adalah 5 mcg/ml dan merupakan dosis standar yang telah digunakan pada penelitian *in vitro* sebelumnya (Jawi *et al.*, 2016). Dosis ini tampaknya merupakan dosis yang optimal untuk peningkatan proliferasi EPC.

Pada PJK stabil terjadi proses aterosklerosis yang didasari oleh disfungsi endotel. Salah satu penyebab terjadinya disfungsi endotel adalah stres oksidatif (Dernbach *et al.*, 2004). Stres oksidatif terbukti memberikan dampak merugikan bagi jumlah dan fungsi EPC. Pemberian antioksidan eksogen bermanfaat dalam

proteksi EPC terhadap stres oksidatif. Ekstrak umbi ubijalar ungu dapat mengurangi stres oksidatif karena mengandung antosianin dalam konsentrasi yang tinggi. Kandungan antosianin pada berbagai umbi ubijalar ungu dari Swiss berkisar antara 0,7-74,3 mg/100 gram umbi segar (Lachman *et al.*, 2009). Sedangkan kandungan antosianin pada umbi ubijalar ungu di Bali berkisar antara 110-210 mg/100 gram umbi segar (Suprpta *et al.*, 2004). Kandungan antosianin yang tinggi pada umbi ubijalar ungu dari Bali ini berperan sebagai antioksidan yang kuat. Hal ini dibuktikan dengan penurunan kadar MDA dan peningkatan kadar SOD pada darah kelinci yang diberi pakan tinggi kolesterol (Jawi, 2013). Studi terbaru membuktikan bahwa antosianin pada ekstrak umbi ubijalar ungu menginduksi peningkatan SOD sebagai antioksidan endogen pada HUVEC (Jawi *et al.*, 2016).

Antosianin merupakan salah satu flavonoid, komponen pada bahan makanan yang mengandung gugus polifenol. Studi oleh Wang dkk (2007) menunjukkan bahwa resveratrol, polifenol yang terkandung dalam anggur merah, tidak hanya meningkatkan jumlah dan aktivitas EPC, tapi juga menghambat penuaan EPC dengan meningkatkan aktivitas telomerase sehingga memperbaiki proliferasi EPC. Pinosembrin, flavonoid yang berasal dari propolis, dapat meningkatkan proliferasi EPC melalui jalur PI3K/Akt/eNOS (Yang *et al.*, 2013), sedangkan flavonoid yang terkandung dalam teh meningkatkan diferensiasi PBMNC menjadi EPC dan memproteksi EPC dari kerusakan oksidatif dengan menekan kadar ROS intrasel (Widowati *et al.*, 2016). Antosianin yang terkandung dalam berbagai bahan makanan terbukti meningkatkan proliferasi EPC secara *in vivo* dan *in vitro* melalui beberapa mekanisme. Ekstrak *chokeberry* meningkatkan proliferasi EPC melalui penurunan kadar ROS intrasel dan perbaikan aktivitas

telomerase yang mencegah penuaan sel (Parzonko *et al.*, 2015), sedangkan jus anggur terbukti mengaktivasi jalur PI3K/Akt/eNOS yang mencegah apoptosis sel (Edirisinghe *et al.*, 2011). Peneliti Liu dkk (2016) menemukan bahwa pemberian prosianidin meningkatkan proliferasi EPC dengan mengatasi kerusakan oksidatif dan *upregulation* ekspresi VEGFR-2 dan jalur sinyal di hulunya.

Penelitian ini merupakan yang pertama meneliti efek pemberian ekstrak umbi ubijalar ungu varietas dari Bali terhadap proliferasi EPC. Hasil yang didapat sesuai dengan dugaan bahwa pemberian ekstrak umbi ubijalar ungu yang mengandung antosianin tinggi dapat meningkatkan proliferasi EPC pada darah tepi penderita PJK stabil. Mekanisme yang mendasari peningkatan proliferasi ini belum diketahui dengan pasti, namun diduga berasal dari efek protektif antosianin terhadap stres oksidatif, serta mencegah penuaan dan apoptosis EPC. Kerja antioksidan dari antosianin sendiri lebih dominan pada aktivasi berbagai jalur transduksi sinyal, termasuk jalur MAPK dan PI3K/Akt/eNOS yang memiliki peran penting pada proliferasi EPC.

## **6.2 Proliferasi EPC pada Pemberian Vitamin C**

Pada penelitian ini terjadi peningkatan proliferasi EPC darah tepi penderita PJK stabil yang bermakna pada pemberian vitamin C dosis rendah (10 mcg/ml), dosis sedang (50 mcg/ml) dan dosis tinggi (250 mcg/ml) dibandingkan dengan kontrol. Antara ketiga dosis vitamin C yang berbeda, semuanya menunjukkan perbedaan peningkatan proliferasi EPC yang bermakna. Peningkatan proliferasi EPC oleh vitamin C terjadi secara *dose-dependent*.

Walaupun antioksidan telah banyak disarankan dalam penanganan dan pencegahan PJK, namun peran vitamin antioksidan masih menjadi perdebatan karena hasil studi klinis yang kontroversial. Beberapa studi *in vitro* menunjukkan respon yang baik dari vitamin C, dimana melalui ROS *scavenging* vitamin C dapat menghambat oksidasi LDL dan memperbaiki *coupling* eNOS. Vitamin C juga bekerja sebagai mediator yang meningkatkan bioavailabilitas NO. Pemberian vitamin C yang dikombinasikan dengan vitamin E memberikan efek positif terhadap kekakuan arteri pada pasien hipertensi (Plantinga *et al.*, 2007). Namun pemberian vitamin C tidak mengurangi risiko terjadinya PJK pada jangka panjang. Pada wanita dengan risiko tinggi terjadinya PJK, asam askorbat tidak memberi efek menguntungkan terhadap kejadian kardiovaskuler (Cook *et al.*, 2007). Sehingga meski studi *in vitro* menunjukkan hasil yang baik, vitamin C tidak terbukti efektif dalam menurunkan risiko kardiovaskuler (Tousoulis *et al.*, 2015).

Pemberian vitamin C bersama vitamin E dapat memperbaiki efek penurunan jumlah EPC yang diinduksi oleh TNF- $\alpha$ . TNF- $\alpha$  mengganggu proliferasi EPC dan dikaitkan dengan penurunan kadar VEGF. Mekanisme yang mendasari hasil ini adalah efek antiapoptosis dari kedua vitamin, bukan melalui peningkatan proliferasi sel itu sendiri (Fiorito *et al.*, 2008). Askorbat sendiri dapat menstimulasi proliferasi sel endotel melalui peningkatan sintesis kolagen tipe IV (Aguirre dan May, 2008) maupun melalui jalur MAPK (Cao *et al.*, 2012).

Hasil pada penelitian ini sesuai dengan studi *in vitro* lainnya yang menunjukkan efek positif vitamin C terhadap jumlah dan fungsi EPC. Pada penelitian ini, efek menguntungkan vitamin C terhadap proliferasi EPC tercapai

pada dosis rendah hingga tinggi, menunjukkan rentang dosis efektif vitamin C yang cukup luas.

### **6.3 Perbedaan Peningkatan Proliferasi EPC dan Jumlah CFU antara Pemberian Ekstrak Umbi Ubijalar Ungu dan Vitamin C**

Dosis rendah dari ekstrak umbi ubijalar ungu dan vitamin C meningkatkan proliferasi EPC secara bermakna jika dibandingkan dengan kontrol, namun di antara kedua kelompok eksperimen ini tidak didapatkan perbedaan. Sedangkan kelompok eksperimen vitamin C dosis sedang dan tinggi mengalami peningkatan proliferasi EPC yang berbeda bermakna jika dibandingkan kelompok eksperimen ekstrak umbi ubijalar ungu dosis sedang dan tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa pada dosis rendah, ekstrak umbi ubijalar ungu dan vitamin C memiliki kemampuan yang setara dalam meningkatkan proliferasi EPC pada darah tepi penderita PJK stabil. Seiring dengan peningkatan dosis, vitamin C cenderung meningkatkan proliferasi EPC lebih tinggi dibanding ekstrak umbi ubijalar ungu. Vitamin C diduga bekerja sebagai *inducer* proliferasi sel yang lebih baik dibanding ekstrak umbi ubijalar ungu.

Hal menarik yang didapat pada penelitian ini adalah tren peningkatan proliferasi EPC yang berbanding terbalik dengan jumlah CFU pada kelompok ekstrak umbi ubijalar ungu dan vitamin C. CFU menggambarkan fungsi dari EPC yang tumbuh dan menunjukkan kualitas diferensiasi EPC tersebut menjadi sel endotel matur. Pada penelitian ini, pemberian vitamin C dosis rendah justru menghasilkan jumlah CFU yang lebih sedikit dibanding kontrol. Sedangkan vitamin C dosis tinggi meningkatkan jumlah CFU dengan drastis dibanding dosis

rendah dan kontrol. Ekstrak umbi ubijalar ungu menyebabkan peningkatan proliferasi EPC yang secara umum lebih rendah dibanding vitamin C, namun jumlah CFU yang terbentuk jauh lebih tinggi dibanding kelompok vitamin C dan kontrol. Terdapat beberapa kemungkinan yang mendasari hasil yang menarik dari penelitian ini. Perbedaan mekanisme kerja antioksidan kedua kelompok ini mungkin berpengaruh, dimana antosianin dari ekstrak umbi ubijalar ungu terutama bekerja melalui aktivasi jalur transduksi sinyal yang mengatur proliferasi, diferensiasi, migrasi, dan *survival* sel. Sedangkan efek antioksidan vitamin C dicapai terutama sebagai donor elektron untuk menangkap ROS sehingga mencegah apoptosis sel, tidak meningkatkan proliferasi sel secara langsung. Sehingga, antosianin yang terkandung dalam ekstrak umbi ubijalar ungu diduga merupakan suatu *inducer* diferensiasi sel yang lebih baik dibanding vitamin C, dengan kemampuan untuk meningkatkan proliferasi sel yang tidak berbeda jauh.

Selain itu, dosis perlakuan mungkin juga berpengaruh terhadap hasil penelitian. Konsentrasi fisiologis asam askorbat di intraseluler berkisar antara 1,3-2,5 mmol/L (~230-440 mcg/ml), sedangkan di ekstraseluler sebesar 50-150  $\mu\text{mol/L}$  (~0,03-0,15 mcg/ml). Pemberian vitamin C dosis rendah (0-100  $\mu\text{mol/L}$ ) pada sel otot polos terbukti dapat menghambat sitotoksitas dan apoptosis yang dicetuskan oleh ox-LDL (Siow *et al.*, 1999). Namun untuk menghambat ikatan ion superoksida dengan NO dibutuhkan askorbat dengan dosis fisiologis yang tinggi (Mikirova *et al.*, 2008). Pada penelitian ini digunakan dosis rendah sebesar 10 mcg/ml dan dosis tinggi sebesar 250 mcg/ml yang menyerupai tingkat konsentrasi askorbat di intrasel. Pada dosis rendah, vitamin C sudah dapat bekerja sebagai antioksidan, sehingga dapat meningkatkan proliferasi EPC melalui efek antiapoptotik. Namun untuk

menghasilkan EPC yang berfungsi baik, mungkin dibutuhkan dosis vitamin C yang setara atau lebih tinggi daripada konsentrasi fisiologis vitamin C di dalam sel.

#### **6.4 Ekspresi Penanda EPC**

Medium CFU-Hill yang digunakan pada penelitian ini merupakan medium khusus untuk menumbuhkan EPC. Namun, sebagai konfirmasi sel yang tumbuh tersebut adalah EPC, maka dilakukan imunofluorosensi menggunakan penanda EPC. EPC pada sirkulasi darah tepi mengekspresikan beberapa penanda, yaitu CD34, CD133 dan VEGFR2, yang digunakan pada penelitian ini adalah CD34. Hasil pemeriksaan menunjukkan sel berpendar hijau yang berarti sel tersebut positif terhadap penanda CD34.

Keterbatasan penelitian ini adalah *range* dosis perlakuan yang terbatas sehingga belum mengetahui dosis optimal serta dosis toksik ekstrak umbi ubijalar ungu dan vitamin C terhadap proliferasi EPC.



## BAB 7

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 7.1 Kesimpulan

- 1) Pemberian ekstrak umbi ubijalar ungu (*Ipomoea batatas L.*) dosis rendah, sedang, dan tinggi terbukti meningkatkan proliferasi EPC pada darah tepi penderita PJK stabil.
- 2) Pemberian vitamin C dosis rendah, sedang, dan tinggi terbukti meningkatkan proliferasi EPC pada darah tepi penderita PJK stabil.
- 3) Tidak ditemukan perbedaan peningkatan proliferasi EPC dari darah tepi penderita PJK stabil pada kelompok yang diberikan ekstrak umbi ubijalar ungu dan vitamin C dosis rendah, sedangkan pada dosis sedang dan tinggi pemberian vitamin C menunjukkan peningkatan proliferasi EPC yang lebih baik dari pada pemberian ekstrak umbi ubijalar ungu dengan dosis yang setara.
- 4) Pada penelitian ini juga ditemukan bahwa ekstrak umbi ubijalar ungu meningkatkan jumlah CFU EPC lebih tinggi dibandingkan vitamin C.

#### 7.2 Saran

- 1) Diperlukan penelitian dengan jumlah sampel yang lebih besa dan *range* dosis yang lebih luas untuk mengetahui tingkatan efek pemberian ekstrak umbi ubijalar ungu dan vitamin C terhadap proliferasi EPC pada darah tepi penderita PJK stabil.

- 2) Diperlukan penelitian untuk menilai mekanisme atau jalur yang mendasari peningkatan proliferasi EPC oleh ekstrak umbi ubijalar ungu dan vitamin C.
- 3) Diperlukan penelitian klinis untuk menilai efek pemberian ekstrak umbi ubijalar ungu dan vitamin C pada pasien PJK stabil.

## DAFTAR PUSTAKA

- Antal, D., Garban, G., Garban, Z. 2003. The Anthocyanins: Biologically-active substances of food and pharmaceutical interest. *The Annals of the University of Galati Fascicle VI-Food Technology*.
- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., *et al.* 1997. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 275: 964-967.
- Asahara, T., Kawamoto, A. 2004. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 287, pp. C572–C579.
- Asahara, T., Kawamoto, A., Masuda, H. 2011. Concise Review: Circulating Endothelial Progenitor Cells for Vascular Medicine. *Stem Cells*, 29:1650–1655.
- Balady, G., Williams, M., Ades, P., Bittner, V., Comoss, P., *et al.* 2007. Core components of cardiac rehabilitation/secondary prevention programs: 2007 update: a scientific statement from the American Heart Association Exercise, Cardiac Rehabilitation, and Prevention Committee, the Council on Clinical Cardiology; the Councils on Cardiovascular Nursing, Epidemiology and Prevention, and Nutrition, Physical Activity, and Metabolism; and the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation. *Circ.*, 115: 2675–2682.
- Barrita, J., Sánchez, M. 2013. Antioxidant role of ascorbic acid and his protective effects on chronic diseases. Dalam: J. Morales-Gonzalez, ed., *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants*. InTech. Dapat diakses pada: <http://www.intechopen.com/books/oxidative-stress-and-chronic-degenerative-diseases-a-role-for-antioxidants/antioxidant-role-of-ascorbic-acid-and-his-protective-effects-on-chronic-diseases>.
- Basili, S., Tanzilli, G., Mangieri, E., *et al.* 2010. Intravenous ascorbic acid infusion improves myocardial perfusion grade during elective percutaneous coronary intervention: relationship with oxidative stress markers. *JACC Cardiovasc. Interv.*, 3: 221-229.
- Bielski, B., Richter, H., Chan, P. 1975. Some properties of the ascorbate free

- radical. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 258: 231–237.
- Cao, N., Liu, Z., Chen, Z., *et al.* 2012. Ascorbic acid enhances the cardiac differentiation of induced pluripotent stem cells through promoting the proliferation of cardiac progenitor cells. *Cell. Res.*, 22: 219-236.
- Carr, A., Zhu, B., Frei, B. 2000. Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E). *Circ. Res.*, 87: 349-354.
- Clark, J., Zahradka, P., Taylor, C. 2015. Efficacy of flavonoids in the management of high blood pressure. *Nutr. Rev.* DOI: 10.1093/nutrit/nuv048.
- Clempus, R.E., Griendling, K.K. 2006. Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc. Res.*, 71: 216-225.
- Cook, N., Albert, C., Gaziano, J., *et al.* 2007. A randomized factorial trial of vitamins C and E and beta carotene in the secondary prevention of cardiovascular events in women: results from the women's antioxidant cardiovascular study. *Arch Intern Med.*, 167:1610–168.
- De Caterina, R., Libby, P., Peng, H., Thannickal, V., Rajavashisth, T., *et al.* 1995. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J. Clin. Invest.*, 96: 60–68.
- De Keulenaer, G., Ushio-Fukai, M., Yin, Q., Chung, A., Lyons, P., *et al.* 2000. Convergence of redox-sensitive and mitogen-activated protein kinase signaling pathways in tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 20: 385–391.
- Dernbach, E., Urbich, C., Brandes, R., *et al.* 2004. Antioxidative stress-associated genes in circulating progenitor cells: evidence for enhanced resistance against oxidative stress. *Blood*, 104(12).
- Dimmeler, S., Hermann, C., Galle, J., Zeiher, A. 1999. Upregulation of superoxide dismutase and nitric oxide synthase mediates the apoptosis suppressive effects of shear stress on endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 19: 656–664.
- Dimmeler, S., Zeiher, A.M. 2000. Reactive oxygen species and vascular cell apoptosis in response to angiotensin II and pro-atherosclerotic factors. *Regul.*

- Pept.*, 90:19–25.
- d’Uscio, L., Milstien, S., Richardson, D., *et al.* 2003. Long-term vitamin C treatment increases vascular tetrahydrobiopterin levels and nitric oxide synthase activity. *Circ. Res.*, 92: 88-95.
- Edirisinghe, I., Banaszewski, K., Cappozzo, J., McCarthy, D., Burton-Freeman, B. 2011. Effect of black currant anthocyanins on the activation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in vitro in human endothelial cells. *J. Agric. Food Chem.*, 59: 8616–8624.
- Fadini, G.P., Agostini, C., Sartore, S., Avogaro, A. 2007. Endothelial progenitor cells in the natural history of atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 194(1): 46-54.
- Fiorito, C., Rienzo, M., Crimi, E., Rossiello, R., Balestrieri, M., *et al.* 2008. Antioxidants increase number of progenitor endothelial cells through multiple gene expression pathways. *Free Radic Res*, 42(8): 754-762.
- Forstermann, U., Munzel, T. 2006. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circ.*, 113: 1708–1714.
- Frei, B., England, L., Ames, B.N. 1989. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 6377-6381.
- Frei, B., Traber, M. 2001. The new US dietary reference for vitamins C and E. *Redox Rep.*, 6: 5-9.
- Fuhrman, B., Aviram, M. 2002. Polyphenols and flavonoids protect LDL against atherogenic modifications. Dalam: Canedas, E., Packer, L., ed., *Handbook of Antioxidants*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, Inc. pp. 306-311.
- Ghosh, D., Konishi, T. 2007. Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: Role in diabetes and eye function. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, 16(2): 200-208.
- Harada, K., Kano, M., Takayanagi, T., Yamakawa, O., Ishikawa, F. 2004. Absorption of acylated anthocyanin in rats and humans after ingesting an extract of Ipomoea batatas purple sweet potato tuber. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68(7): 1500-1507.
- Herring, T., Albrecht, J. 2005. Functional Foods. Extension Circular. University of Nebraska. Dapat diakses pada:  
[www.reeis.usda.gov/web/crisprojectpages/0196754](http://www.reeis.usda.gov/web/crisprojectpages/0196754).

- Herrman, J., Saguner, A.M., Versari, D., Peterson, T.E., Chade, A., *et al.* 2007. Chronic proteasome inhibition contributes to coronary atherosclerosis. *Circ. Res.*, 101: 865-874.
- Hill, J., Zalos, G., Halcox, J., Schenke, W., Waclawiw, M., *et al.* 2003. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*, 348: 593–600.
- Hirsch, K., Ingram, D., Yoder, M. 2008. Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28:1584-1595.
- Holmes, K., Roberts, O., Thomas, A., Cross, M. 2007. Vascular endothelial growth factor receptor-2: Structure, function, intracellular signaling and therapeutic inhibition. *Cell. Signal.*, 19(10): 2003–2012.
- Hornig, D., Weber, F., Wiss, O. 1973. Site of intestinal absorption of ascorbic acid in guinea pigs and rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 52: 168–172.
- Hristov, M., Erl, W., Weber, P. 2003. Endothelial progenitor cells mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, 23:1185-1189.
- Imanishi, T., Tsujioka, H., Akasaka, T. 2008. Endothelial progenitor cells dysfunction and senescence: contribution to oxidative stress. *Curr. Cardiol. Rev.*, 4: 275-286.
- Iuliano, L., Pratico, D., Greco, C., *et al.* 2001. Angioplasty increases coronary sinus F2-isoprostane formation: evidence for in vivo oxidative stress during PTCA. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 37: 76-80.
- Jawi, I., Suprpta, D., Dwi, S., Wiwiek, I. 2008. Ubi jalar ungu menurunkan kadar MDA dalam darah dan hati mencit setelah aktivitas fisik maksimal. *Jurnal Veteriner, Jurnal Kedokteran Hewan Indonesia*, 9(2): 65-72.
- Jawi, I., Budiasa, K. 2011. Ekstrak air umbi ubi jalar ungu menurunkan total kolesterol serta meningkatkan total antioksidan pada darah kelinci. *Jurnal Veteriner, Jurnal kedokteran Hewan Indonesia*, 12(2): 120-125.
- Jawi, I., Indrayani, W., Arijana, I., Subawa, A., Suprpta, D. 2016. Aqueous extratec of purole sweet potato increased SOD-2 and SOD-3 expression on human umbilical vein endothelial cells in vitro. *J. Biol. Agric. Health.c*, 6(2): 103-110.

- Jusuf , M., Rahayuningsih, A., Ginting, E. 2011. Ubijalar Ungu. Balai Penelitian Tanaman Kacang-kacangan dan Umbi-umbian. Dapat diunduh pada: <http://pustaka.litbang.deptan.go.id/publikasi/wr304088.pdf>. Diunduh tanggal 10 Januari 2016.
- Kano, M., Takayanagi, T., Harada, K., Makino, K., Ishikawa, F. 2005. Antioxidative activity of anthocyanin from purple sweet potato, Ipomoea batatas cultivar Ayamurasaki. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69(5): 979-988.
- Karlsen, A., Retterstol, L., Laake, P., Paur, I., Kjolsrud-Bohn, S., Sandvik, L., *et al.* 2007. Anthocyanins inhibit nuclear factor-KB activation in monocytes and reduce plasma concentration of pro-inflammatory mediators in healthy adults. *J. Nutr.*, 137: 1951-1954.
- Khan, B., Harrison, D., Olbrych, M., Alexander, R., Medford, R. 1996. Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 9114–9119.
- Kim, H., Bae, S., Kim, Y., *et al.* 2013. Vitamin C prevents stress-induced damage on the heart caused by the death of cardiomyocytes, through downregulation of the excessive production of catecholamine, TNF-alpha, and ROS production in Gulo(-/-) mice. *Free Radic. Biol. Med.*, 65C: 573-583.
- Kubes, P., Suzuki, M., Granger, D.N. 1991. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 4651–4655.
- Lachman, J., Hamouz, K., Sulc, M., Orsak, M., Pivec, V., *et al.* 2009. Cultivar differences of total anthocyanins and anthocyanidins in red and purple-fleshed potatoes and their relation to antioxidant activity. *Food Chem.*, 144: 836-843.
- Lehr, H., Frei, B., Arfors, K. 1994. Vitamin C prevents cigarette smoke-induced leukocyte aggregation and adhesion to endothelium in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 7688-7692.
- Lehr, H., Frei, B., Olofsson, A., Carew, T., Arfors, K. 1995. Protection from oxidized LDL induced leukocyte adhesion to microvascular and macrovascular endothelium in vivo by vitamin C but not by vitamin E. *Circ.*, 91: 1552-1532.

- Levine, M., Conry-Cantilena, C., Wang, Y., Welch, R., Washko, P., *et al.* 1996. Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a recommended dietary allowance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 3704–3709.
- Li, Y., Schellhorn, H. 2007. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *J. Nutr.*, 137: 2171–2184.
- Liew, A., Barry, F., O’Brien, T. 2006. Endothelial progenitor cells: diagnostic and therapeutic considerations. *BioEssays*, 28: 261-270.
- Lin, S.J., Shyue, S.K., Hung, Y.Y., Chen, Y.H., Ku, H.H., *et al.* 2005. Superoxide dysmutase inhibits the expression of vascular cell adhesion molecule-1 and intracellular cell adhesion molecule-1 induced by tumor necrosis factor-alpha in human endothelial cells through the JNK/p38 pathway. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 25(2): 334-340.
- Lin, C., Lin, F., Huang P., *et al.* 2013. Endothelial progenitor cell dysfunction in cardiovascular diseases: role of reactive oxygen species and inflammation. *Biomed. Res. Int.*, 2013.
- Martí-Fàbregas, J., Delgado-Mederos, R., Crespo, J., Peña, E., Marín, R., *et al.* 2015. Circulating endothelial progenitor cells and the risk of vascular events after ischemic stroke. *PLoS ONE*, 10(4): e0124895.
- Martin, A., Frei, B. 1997. Both intracellular and extracellular vitamin C inhibit atherogenic modification of LDL by human vascular endothelial cells. *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 17: 1583-1590.
- Marui, N., Offermann, M., Swerlick, R., Kunsch, C., Rosen, C., *et al.* 1993. Vascular cell-adhesion molecule-1 (Vcam-1) gene-transcription and expression are regulated through an antioxidant sensitive mechanism in human vascular endothelial-cells. *J. Clin. Invest.*, 92: 1866–1874.
- May, J., Harrison, F. 2013. Role of vitamin C in the function of the vascular endothelium. *Antioxid. Redox. Signal.*, 19(17): 2068-2083.
- Mercier, P., Ekindjian, O. 1990. Collagen type IV: major component of basement membranes. Current knowledge. *Ann. Biol. Clin.*, 48: 695–711.
- Mikirova, N., Ichim, T., Riordan, N. 2008. Antiangiogenic effect of high doses of ascorbic acid. *J. Transl. Med.*, 6:50.



- Montilla, E., Hillebrand, S., Butschbach, D., Baldermann, S., Watanabe, N., Winterhalter, P. 2010. Preparative isolation of anthocyanins from Japanese purple sweet potato (*Ipomoea batatas*) varieties by high-speed countercurrent chromatography. *J. Agric. Food. Chem.*, 58: 9899-9904.
- Naidu, K. 2003. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutrition J.*, 2:7.
- Nelson, E., Lane, H., Fabri, P., Scott, B. 1978. Demonstration of saturation kinetics in the intestinal absorption of vitamin C in man and the guinea pig. *J. Clin. Pharmacol.*, 18: 325-335.
- Nishikimi, M., Yagi, K. 1996. Biochemistry and molecular biology of ascorbic acid biosynthesis. *Subcell Biochem.*, 25: 17-39.
- Oki, T., Osame, M., Kobayashi, M., Furuta, S., Nishiba, Y., Kumagai, T., *et al.* 2003. Simple rapid spectrophotometric method for selecting purple-fleshed sweet potato cultivars with a high radical scavenging activity. *Breed. Sci.*, 53: 101-107.
- Oktaviono, Y., Sardjowo, D., Widodo, M., Dirgantara, Y., Chouw, A., Sandra, F. 2014. Proliferation of peripheral blood-derived endothelial progenitor cells from stable angina subjects. *Indones. Biomed. J.*, 6(2): 91-96.
- Padda, M. 2006. "Phenolic composition and antioxidant activity of sweet potatoes (*Ipomoea batatas*, L)" (A Dissertation). Submitted to the Graduate Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College in partial fulfillment of the requirement for the degree of Doctor of Philosophy in the Department of Horticulture.
- Padayatty, S., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., *et al.* 2003. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J. Am. Coll. Nutr.*, 22(1): 18-35.
- Parzonko, A., Oswit, A., Bazytko, A., Naruszewicz, M. 2015. Anthocyanins-rich *Aronia melanocarpa* extract possesses ability to protect endothelial progenitor cells against angiotensin II induced dysfunction. *Phytomedicine*, 22(14): 1238-1246.
- Peterkofsky, B. 1991. Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy. *Am. J.*

- Clin. Nutr.*, 54: 1135S–1140S.
- Plantinga, Y., Ghiadoni, L., Magagna, A., *et al.* 2007. Supplementation with vitamins C and E improves arterial stiffness and endothelial function in essential hypertensive patients. *Am J Hypertens.*, 20: 392–397.
- Pusdatin Kementerian Kesehatan RI, Badan Litbangkes Kementerian Kesehatan RI dan Data Penduduk Sasaran. 2013. *Data Riset Kesehatan Dasar*. Dapat diakses di: [www.depkes.go.id](http://www.depkes.go.id). Diunduh pada 23 Agustus 2015.
- Recchioni, R., Marcheselli, F., Moroni, F., Pieri, C. 2002. Apoptosis in human aortic endothelial cells induced by hyperglycemic condition involves mitochondrial depolarization and is prevented by N-acetyl-Lcysteine. *Metab. Clin. Exp.*, 51: 1384–1388.
- Rixen, H., Kirkpatrick, C., Schmitz, U., Ruchatz, D., Mittermayer, C. 1989. Interaction between endothelial cells and basement membrane components. In vitro studies on endothelial cell adhesion to collagen types I, III, IV and high molecular weight fragments of IV. *Exp. Cell Biol*, 57: 315–323.
- Rössig, L., Dimmeler, S., Zeiher, A. 2001. Apoptosis in the vascular wall and atherosclerosis. *Basic Res. Cardiol.*, 96: 11–22.
- Rössig, L., Hoffmann, J., Hugel, B., Mallat, Z., Haase, A., *et al.* Vitamin C inhibits endothelial cell apoptosis in congestive heart failure. *Circ.*, 104: 2182–2187.
- Saeed, R., Peng, T., Metz, C. 2003. Ascorbic acid blocks the growth inhibitory effect of tumor necrosis factor alpha on endothelial cells. *Exp. Biol. Med.*, 228: 855–865.
- Salingova, B., Madarasova, M., Stejskal, S., Tesarova, L., Simara, P., Koutna, I. 2014. From endothelial progenitor cells to tissue engineering: how far have we come? *J. Stem Cell Res. Ther.*, 4: 3.
- Shantsila, E., Watson, T., Lip, G. 2007. Endothelial progenitor cells in cardiovascular disorders. *J Am Coll Cardiol*, 49: 741-752.
- Shihabi, A., Li, W., Miller, F., *et al.* 2002. Antioxidant therapy for atherosclerotic vascular disease: the promise and the pitfalls. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 282: H797-802.
- Shipp, J., Abdel-Aal, E. 2010. Food applications and physiological effects of anthocyanins as functional food ingredients. *Open Food Sci. J.*, 4: 7-22.

- Siddique, A. 2010. Endothelial progenitor cells: what use for the cardiologist? *J. Angiogenes. Res.*, 2:6.
- Sindler, A., Reyes, R., Chen, B., Ghosh, P., Gurovich, A., *et al.* 2013. Age and exercise training alter signaling through reactive oxygen species in the endothelium of skeletal muscle arterioles. *J. Appl. Physiol.*, 114: 681-693.
- Siow, R., Richards, J., Pedley, K., Leake, D., Mann, G. 1999. Vitamin C protects human vascular smooth muscle cells against apoptosis induced by moderately oxidized LDL containing high levels of lipid hydroperoxides. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 19: 2387-2394.
- Siti, H., Kamisah, Y., Kamsiah, J. 2015. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascul. Pharmacol.*, 71: 40-56.
- Spencer, J. 2010. Beyond antioxidants: the cellular and molecular interactions of flavonoids and how these underpin their actions on the brain. *Proc. Nutr. Soc.*, 69 (2): 244-260.
- Stocker, R., Keaney, J. 2004. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol. Rev.*, 84: 1381–1478.
- Suda, I., Oki, T., Masuda, M., Kobayashi, M., Nishiba, Y., Furuta, S. 2003. Physiological functionality of purple sweet potatoes containing anthocyanins and their utilization in foods. *JARQ*, 37(3): 167-173.
- Sukmawati, D., Tanaka, R. 2015. Introduction to next generation of endothelial progenitor cell therapy: a promise in vascular medicine. *Am. J. Transl. Res.*, 7(3): 411-421.
- Sun, C., Fan, S., Wang, X., Lu, J., Zhang, Z., *et al.* 2015. Purple sweet potato color inhibits endothelial premature senescence by blocking the NLRP3 inflammasome. *J. Nutr. Biochem.*, 26(10): 1029-1040.
- Suprpta, D., Antara, M., Arya, N., *et al.* 2004. Kajian Aspek Pembibitan, Budidaya dan pemanfaatan Umbi-umbian sebagai Sumber Pangan Alternatif. *Laporan Hasil Penelitian Kerjasama BAPEDA Provinsi Bali dengan Fakultas Pertanian Universitas Udayana.*
- Tagawa, S., Nakanishi, C., Mori, M., Yoshimuta, T., Yoshida, S., *et al.* 2015. Determination of early and late endothelial progenitor cells in peripheral

- circulation and their clinical association with coronary artery disease. *Int. J. Vasc. Med.* doi:10.1155/2015/674213.
- Takanaga, H., Mackenzie, B., Hediger, A. 2004. Sodium-dependent ascorbic acid transporter family SLC23. *Pflugers Arch.*, 447: 677–682.
- Taniyama, Y., Griendling, K.K. 2003. Reactive oxygen species in the vasculature. Molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*, 42: 1075-1081.
- Tousoulis, D., Andreou, I., Antoniadis, C., Tentoloris, C., Stefanadis, C. 2008. Role of inflammation and oxidative stress in endothelial progenitor cell function and mobilization: therapeutic implications for cardiovascular diseases. *Atherosclerosis*, 201: 236-247.
- Tousoulis, D., Psaltopoulou, T., Androulakis, E., Papageorgiou, N., Papaioannou, S., *et al.* 2015. Oxidative stress and early atherosclerosis: novel antioxidant treatment. *Cardiovasc. Drugs Ther.*, 29(1): 75-88.
- Trinidad, E., Gutiérrez, S., López, A., Orozco, M. 2013. Disease and therapy: a role for oxidants. In: J. Morales-Gonzales, ed., *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants*. InTech. Dapat diakses pada: <http://www.intechopen.com/books/oxidative-stress-and-chronic-degenerative-diseases-a-role-for-antioxidants/disease-and-therapy-a-role-for-oxidants>.
- Tsukaguchi, H., Tokui, T., Mackenzie, B., Berger, U., Chen, X., *et al.* 1999. A family of mammalian Na<sup>+</sup>-dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature*, 399: 70–75.
- Urbich, C., Dimmeler, S. 2004. Endothelial progenitor cells characterization and role in vascular biology. *Circ. Res.*, 95: 343-353.
- Vasa, M., Fichtlscherer, S., Aicher, A., *et al.* 2001. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ. Res.*, 89: e1-e7.
- Wang, X., Huang, J., Zou, J., Su, E., Shan, Q., *et al.* 2007. Effects of resveratrol on number and activity of endothelial progenitor cells from human peripheral blood. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 34: 1109-1115.

- Wang, Z., Hu, W., Liu, Y., *et al.* 2014. The effect of intravenous vitamin c infusion on periprocedural myocardial injury for patients undergoing elective percutaneous coronary intervention. *Can. J. Cardiol.*, 30: 96-101.
- WHO. 2015. Cardiovascular diseases (CVDs). Dapat diakses: [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/about\\_cvd/en/](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/about_cvd/en/). Diakses pada 12 Desember 2015.
- Widowati, W., Wijaya, L., Laksmiawati, D., Widyanto, R., Erawijantari, P., *et al.* 2016. Tea flavonoids induced differentiation of peripheral blood-derived mononuclear cells into peripheral blood-derived endothelial progenitor cells and suppressed intracellular reactive oxygen species level of peripheral blood-derived endothelial progenitor cells. *Nat. Prod. Sci.*, 22(2): 87-92.
- Wrolstad, R. 2001. The possible health benefits of anthocyanin pigments and polyphenolics. Pada: *The Linus Pauling Institute*. Dapat diakses: <http://lpi.oregonstate.edu/ss01/anthocyanin.html>. Diakses pada: 12 November 2015.
- Wu, X., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., Gebhardt, S., Prior, R. 2004. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agric. Food Chem.*, 52(12): 4026-4037.
- Xia, M., Ling, W., Zhu, H., *et al.* 2007. Anthocyanin prevents CD40-activated proinflammatory signaling in endothelial cells by regulating cholesterol distribution. *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 27: 519-524.
- Xia, M., Ling, W., Zhu, H., Ma, J., Wang, Q., *et al.* 2009. Anthocyanin attenuates CD40-mediated endothelial cell activation and apoptosis by inhibiting CD40-induced MAPK activation. *Atherosclerosis*, 202(1): 41-47.
- Xu, J., Ikeda, K., Yamori, Y. 2004. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by cyanidin-3-glucoside, a typical anthocyanin pigment. *Hypertension*, 44: 217-22.
- Xu, J., Liu, X., Jiang, Y., Chu L., Hao, H., *et al.* 2008. MAPK/ERK signaling mediated VEGF-induced bone marrow stem cell differentiation into endothelial cell. *J. Mol. Med.*, 12: 2395-2406.
- Yang N, Qin S, Wang M, Chen B, Yuan N, *et al.* 2013. Pinocembrin, a major flavonoid in propolis, improves the biological functions of EPCs derived from

- rat bone marrow through the PI3K-eNOS-NO signaling pathway. *Cytotechnology*, 65: 541–551.
- Yao, E., Yu, Y., Fukuda, N. 2006. Oxidative stress on progenitor and stem cells in cardiovascular diseases. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 7: 101-108.
- Ye, Y., Li, J., Yuan, Z. 2013. Effect of antioxidant vitamin supplementation on cardiovascular outcomes: a meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One*, 8: e56803.
- Yoshikawa, K., Takahashi, S., Imamura, Y., Sado, Y., Hayashi, T. 2001. Secretion of non-helical collagenous polypeptides of alpha1(IV) and alpha2(IV) chains upon depletion of ascorbate by cultured human cells. *J. Biochem.*, 129: 929–936.
- Zhang, W., Hui, T. 2002. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell. Res.* 12(1):9-18.
- Zhang, Y., Wang X., Wang, Y., Liu, Y., Xia, M. 2013. Supplementation of cyanidin-3-O-b-glucoside promotes endothelial repair and prevents enhanced atherogenesis in diabetic apolipoprotein E-deficient mice. *J. Nutr.*, 143: 1248–1253.



		7. Alfa bloker: 8. Aspilet 9. Statin: 10. Lain-lain: 11. N/A
--	--	--

**PEMERIKSAAN FISIK**

Tanda-tanda Vital		Sebelum pemeriksaan	Setelah pemeriksaan
Tekanan Darah	:	/ mmHg	/ mmHg
Nadi	:	x/m	x/m
Frekuensi Napas	:	x/m	x/m
<b>Pemeriksaan Thoraks</b>			
Ictus cordis	:		
S1	:		
S2	:		
Murmur	:	1. Ya	2. Tidak
		Bila Ya sebutkan:	
<i>Gallop</i>	:	1. Ya	2. Tidak
Vesikuler paru	:	1. Normal	2. Tidak normal
Rhonkhi	:	1. Ada	2. Tidak ada
<i>Wheezing</i>	:	1. Ada	2. Tidak ada
<b>Pemeriksaan fisik lain yang signifikan</b> (Bila tdk ada kelainan signifikan, lingkari N/A)			
Kepala/Leher	:	N/A	
Thoraks	:	N/A	
Abdomen	:	N/A	
Ekstremitas	:	N/A	

**PEMERIKSAAN PENUNJANG**

EKG	:	
<i>Roentgen</i> thoraks	:	
Ekokardiografi	:	



Angiografi koroner	:	
--------------------	---	--

**DATA LABORATORIUM**

Hb	:		g/dl
Leukosit	:		$\times 10^3/\mu\text{L}$
Platelet	:		$\times 10^3/\mu\text{L}$
BUN	:		mg/dL
SK	:		mg/dL
SGOT	:		ml/menit
SGPT	:		U/L
GDA	:		U/L
GDP	:		U/L
GD2JPP	:		ng/ml
Total <i>cholesterol</i> (TC)	:		mg/dL
LDL	:		mg/dL
HDL	:		mg/dL
Trigliserida	:		mg/dL

Surabaya, .....2016  
Dokter Peneliti,

**dr. Luh Oliva Saraswati Suastika**



## Lampiran 2

### INFORMASI UNTUK DISETUJUI SUBJEK PENELITIAN (INFORMATION FOR CONSENT)

- Judul : Efek Pemberian Ekstrak Umbi Ubijalar Ungu dan Vitamin C Terhadap Proliferasi(Pembiakan) *Endothelial Progenitor Cells* (Sel Cikal Bakal Lapisan Dalam Pembuluh Darah) Penderita Penyakit Jantung Koroner Stabil
- Peneliti : dr. Luh Oliva Saraswati Suastika  
Dr. dr. Yudi Her Oktaviono, SpJP(K)  
Prof. Dr. dr. Djoko Soemantri, SpJP(K) FIHA
- Alamat : Departemen Ilmu Kardiologi dan Kedokteran Vaskuler  
RSUD Dr. Soetomo Jl. Prof. Dr. Moestopo No 6-8  
Surabaya

Pada formulir ini bila ada kata-kata yang tidak Anda mengerti, silahkan langsung ditanyakan kepada peneliti untuk mendapat penjelasan.

#### Pendahuluan

1. Formulir persetujuan ini memberi informasi tentang manfaat dan risiko bila Anda menjadi subyek penelitian ini. Bila Anda bersedia menjadi subyek dalam penelitian ini, Anda diminta untuk menandatangani formulir ini.
2. Sebelum dan selama Anda menjadi subyek penelitian dalam penelitian ini, Anda berhak menanyakan dan berkonsultasi pada tim dokter peneliti (Jantung dan Pembuluh Darah). Keikutsertaan Anda sebagai subyek penelitian ini bersifat tidak wajib.

#### Mengapa Anda dilibatkan dalam penelitian ini?

Anda dilibatkan dalam penelitian ini oleh karena anda adalah penderita penyakit jantung koroner stabil. Pada penyakit jantung koroner stabil didapatkan jumlah sel cikal bakal lapisan pembuluh darah yang rendah. Peran utama dari sel cikal bakal lapisan pembuluh darah adalah memperbaiki kerusakan pembuluh darah melalui proses pembentukan pembuluh darah baru (vaskulogenesis) dan dari pembuluh darah yang sudah ada sebelumnya (angiogenesis). Seiring dengan kemajuan riset beberapa tahun terakhir, sel punca jenis sel cikal bakal lapisan pembuluh darah telah menjadi target terapi yang potensial untuk menstimulasi angiogenesis, vaskulogenesis dan memperbaiki kinerja jantung.

### **Tujuan Penelitian**

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak umbi ubijalar ungu dan vitamin C terhadap pembiakan sel-sel cikal bakal lapisan pembuluh darah.

### **Manfaat Penelitian**

#### Bagi Subjek

Bagi anda yang berkenan ikut serta dalam penelitian ini, anda akan mendapatkan informasi jumlah sel cikal bakal lapisan dalam pembuluh darah anda, dimana informasi ini dapat memperkirakan besarnya risiko kejadian penyakit jantung dan pembuluh darah anda di masa depan. Setelah itu anda berhak untuk berkonsultasi dengan tim dokter peneliti mengenai terapi yang optimal untuk penyakit anda.

#### Bagi Masyarakat

Diharapkan dapat menambah pengetahuan mengenai peran penting antioksidan terhadap pembiakan sel cikal bakal lapisan pembuluh darah. Apabila ekstrak umbi ubijalar ungu dan vitamin C terbukti dapat meningkatkan pembiakan sel cikal bakal lapisan pembuluh darah, maka ekstrak umbi ubijalar ungu dan vitamin C dapat dipertimbangkan menjadi bagian dari tatalaksana penyakit jantung koroner stabil.

### **Penjelasan Penelitian dan Prosedurnya :**

Anda akan menjadi subyek penelitian ini dengan proses seleksi yang dilakukan oleh peneliti untuk menentukan apakah Anda dapat menjadi subyek penelitian ini. Bila terseleksi, Anda dapat menjadi subyek penelitian dengan dilakukan pemeriksaan sebagai berikut :

1. Anamnesa (pengambilan data melalui wawancara maupun tanya jawab), pemeriksaan fisik, foto roentgen dada, laboratorium dan ekokardiografi akan dilakukan sebagai pemeriksaan awal
2. Anda akan dimintai persetujuan dengan menandatangani lembar persetujuan untuk menjadi subyek penelitian. Bila setuju akan dipersiapkan semua prosedur oleh peneliti dan perawat terlatih.
3. Prosedur angiografi koroner diagnostik:
  - a) Pasien berbaring diatas meja operasi.
  - b) Mensterilkan area pembuluh darah arteri yang akan di tusuk dengan betadine
  - c) Pasang doek (kain) steril seluruh tubuh kecuali muka
  - d) Dilakukan penyuntikan anestesi lokal (penghilang rasa sakit) dengan lidokain 2% pada area yang akan di tusuk
  - e) Dilakukan penusukan arteri dengan jarum khusus
  - f) Pemilihan selang (guiding kateter) sesuai dengan sudut atau arah dari pembuluh darah yang optimal.

- g) Dilakukan injeksi kontras dan dengan sinar X dinilai pembuntuan pembuluh darah koroner.
  - h) Selama dan sampai dengan 24 jam sesudah prosedur kateterisasi akan dilakukan pemantauan klinis untuk menilai keamanan prosedur.
4. Prosedur tindakan pengambilan darah tepi pasien:
- a) Sebanyak 30 cc darah tepi pasien diambil di area dalam siku
  - b) Darah tepi yang didapat diproses dengan sentrifugasi (metode pemisahan) dan dibiakkan di media kultur yang telah disiapkan di *Institute of Tropical Disease* Universitas Airlangga Surabaya
  - c) Sel darah tepi yang telah dikultur pada media penumbuh sel punca kemudian dilakukan pemeriksaan kandungan CD34 dan CD133 (salah satu molekul penanda) untuk memastikan pertumbuhan sel progenitor endotel.
  - d) Masing-masing kelompok sel progenitor endotel akan diberikan perlakuan berupa penambahan ekstrak umbi ubijalar ungu atau vitamin C atau tidak mendapat perlakuan sama sekali. Kemudian akan dilakukan penghitungan jumlah sel progenitor endotel yang hidup dan yang mati.

### **Risiko dan Komplikasi**

1. Risiko tindakan pengambilan darah dan angiografi koroner akan disampaikan sejak awal dan pencegahan risiko tetap akan dilakukan sesuai prosedur tetap persiapan tindakan oleh tim kardiologi intervensi dan anestesi.
2. Resiko efek samping tindakan akan disampaikan dan bisa terjadi sesuatu akan dicatat dan ditangani oleh peneliti dan tim. Beberapa risiko yang bisa terjadi :
  - a. Risiko pembiusan/anestesi
    - Cukup sering : mual, muntah, batuk kering, mata kabur, nyeri kepala, nyeri punggung, gatal, lebam di tempat penyuntikan, hilang ingatan sementara
    - Jarang : infeksi dada, kesulitan berkemih, nyeri otot, cedera pada bibir, gigi, dan lidah, perubahan perasaan atau perilaku, dan mimpi buruk
    - Sangat jarang : cedera mata, alergi obat yang cukup serius, cedera saraf, kelumpuhan dan kematian
  - b. Risiko pengambilan darah
 

Perdarahan, bengkak, nyeri daerah suntikan, cidera saraf sekitar tempat suntikan, terbentuknya sumbatan di tempat pengambilan darah, penularan penyakit dan infeksi melalui pembuluh darah. Pengambilan darah dalam jumlah yang cukup banyak (30 cc) dapat menimbulkan keluhan pusing, badan lemah hingga pingsan.
  - c. Risiko kateterisasi jantung

Perdarahan, bengkak di area suntikan, infeksi yang masuk melalui area suntikan, robeknya pembuluh darah, sumbatan akut pada pembuluh darah, serangan jantung mendadak, gangguan irama jantung, alergi kontras, gangguan ginjal, stroke, gagal jantung dan kematian dalam jumlah sangat kecil.

### **Sumber Pembiayaan**

Pembiayaan penelitian dibebankan kepada peneliti dan dana lain yang diperoleh dari sumbangan sukarela. Rincian dana terdiri dari:

1. Pemeriksaan laboratorium : Rp 500.000,-
2. Pemeriksaan EKG : Rp 50.000,-
3. Pemeriksaan foto rontgen : Rp 100.000,-
4. Pemeriksaan ekokardiografi : Rp 300.000,-
5. Pemeriksaan dan Kultur sel punca : Rp 10.000.000,-
6. Pemeriksaan angiografi koroner : Rp 5.000.000,-

Besar nominal untuk pemeriksaan sel punca sesuai dengan ketentuan *Institute of Tropical Disease* Universitas Airlangga, sedangkan besar nominal untuk tindakan disesuaikan dengan peraturan daerah mengenai tarif tindakan kateterisasi di RSUD Dr Soetomo.

### **Kerahasiaan**

Semua catatan kesehatan Anda yang diperoleh selama penelitian akan dijamin kerahasiaannya. Informasi yang akan digunakan untuk kepentingan analisa data, publikasi di jurnal/pertemuan ilmiah hanya boleh disampaikan dalam bentuk nama inisial, sedangkan nama asli hanya diketahui oleh peneliti.

### **Informasi Perkembangan Penyakit Selama Masa Penelitian**

- Anda berhak dan dianjurkan untuk bertanya tentang penelitian ini setiap saat. Jika Anda mempunyai pertanyaan mengenai penelitian atau mengalami gangguan yang menurut Anda berhubungan dengan penelitian, maka Anda bisa menghubungi :

**dr. Luh Oliva Saraswati Suastika : 081330530247**

### **Penarikan Kembali Dalam Penelitian/ Hak Undur Diri**

- Partisipasi Anda sebagai subyek penelitian ini adalah sukarela. Anda dapat memutuskan untuk tidak melanjutkan keikutsertaan sebagai subyek dalam penelitian tanpa mendapatkan sanksi apapun dari siapapun.

Surabaya, \_\_\_\_\_ 2016

Yang mendapat Informasi  
Subyek Penelitian

( \_\_\_\_\_ )

Saksi 1  
(Dari Pihak Peneliti)

( \_\_\_\_\_ )

Yang Memberi Informasi  
Peneliti

dr. Luh Oliva Saraswati Suastika

Saksi 2  
(Dari Pihak Subjek)

( \_\_\_\_\_ )

**PEMBERIAN INFORMASI**  
**PERSETUJUAN UNTUK MENJADI SUBYEK PENELITIAN**  
**Efek Pemberian Ekstrak Umbi Ubijalar Ungu dan Vitamin C Terhadap Proliferasi**  
**(Pembiakan) *Endothelial Progenitor Cells* (Sel Cikal Bakal Lapisan Dalam**  
**Pembuluh Darah) Penderita Penyakit Jantung Koroner Stabil**

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama :

Umur :

Jenis Kelamin : Laki-laki/Perempuan

Alamat :

No. Telp :

Bersedia menjadi subjek penelitian dengan judul :

**Efek Pemberian Ekstrak Umbi Ubijalar Ungu dan Vitamin C Terhadap**  
**Proliferasi (Pembiakan) *Endothelial Progenitor Cells* (Sel Cikal Bakal**  
**Lapisan Dalam Pembuluh Darah) Penderita Penyakit Jantung Koroner**  
**Stabil**

Dan telah memahami penjelasan/ Informasi yang diberikan oleh peneliti secara lengkap dan jelas. Demikian pernyataan ini saya buat dengan penuh kesadaran, serta tanpa paksaan maupun tekanan dari siapapun juga

Surabaya, \_\_\_\_\_ 2016

Subyek Penelitian

(\_\_\_\_\_)

Saksi 1  
(Dari Pihak Peneliti)

Saksi 2  
(Dari Pihak Subjek)

(\_\_\_\_\_)

(\_\_\_\_\_)

## HASIL ANALISA STATISTIK

### Descriptives

#### Baseline characteristic

	Valid	umur	TDS	TDD	TB	BB	BMI	LVEF	HR	Total Chol	TG	HDL	LDL
N	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Mean		54.5000	137.5000	80.0000	168.0000	70.2500	25.3900	53.5000	86.0000	200.50	97.00	35.00	145.00
Std. Error of Mean		1.52362	8.60855	2.67261	.46291	2.24205	.75360	1.45160	3.07060	26.428	4.114	2.699	21.605
Median		55.5000	145.0000	80.0000	167.5000	69.5000	25.5550	54.0000	85.0000	201.50	100.50	36.00	147.50
Mode		48.00(a)	100.00(a)	80.00	167.00	64.00(a)	22.49(a)	48.00(a)	76.00(a)	117(a)	79(a)	42	82(a)
Std. Deviation		4.30946	24.34866	7.55929	1.30931	6.34147	2.13149	4.10575	8.68496	74.751	11.637	7.635	61.109
Variance		18.571	592.857	57.143	1.714	40.214	4.543	16.857	75.429	5587.714	135.429	58.286	3734.286
Range		11.00	60.00	20.00	3.00	14.00	5.47	10.00	22.00	165	29	16	121
Minimum		48.00	100.00	70.00	167.00	64.00	22.49	48.00	76.00	117	79	26	82
Maximum		59.00	160.00	90.00	170.00	78.00	27.96	58.00	98.00	282	108	42	203
Sum		436.00	1100.00	640.00	1344.00	562.00	203.12	428.00	688.00	1604	776	280	1160

a Multiple modes exist. The smallest value is shown

#### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		kontrol	vitClow	VitCmed	vitChigh	IMOlw	IMOmed	IMOhigh
N		8	8	8	8	8	8	8
Normal Parameters(a,b)	Mean	.1701	.2593	.3066	.3526	.2504	.2870	.2971
	Std. Deviation	.00759	.01652	.02230	.02298	.00534	.04273	.00973
Most Extreme Differences	Absolute	.132	.164	.167	.303	.187	.440	.211
	Positive	.132	.164	.167	.303	.187	.303	.155
	Negative	-.118	-.143	-.140	-.175	-.148	-.440	-.211
Kolmogorov-Smirnov Z		.372	.463	.472	.857	.528	1.245	.596
Asymp. Sig. (2-tailed)		.999	.983	.979	.454	.943	.090	.869

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.



**Group Statistics**

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
kontrol	kontrol	8	.17013	.007586	.002682
	vit c low 48 jam	8	.25925	.016525	.005842

**Independent Samples Test**

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
kontrol	Equal variances assumed	4.761	.047	-13.864	14	.000	-.089125	.006429	-.102913	-.075337
	Equal variances not assumed			-13.864	9.825	.000	-.089125	.006429	-.103484	-.074766

**Group Statistics**

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
kontrol	kontrol	8	.17013	.007586	.002682
	imo low 48 jam	8	.25038	.005344	.001889

**Independent Samples Test**

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
								95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
Equal variances assumed	.890	.361	-24.461	14	.000	-.080250	.003281	-.087287	-.073213
Equal variances not assumed			-24.461	12.574	.000	-.080250	.003281	-.087362	-.073138

**Descriptives****Absorbance**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
kontrol	8	.17013	.007586	.002682	.16378	.17647	.159	.182
vitClow	8	.25925	.016525	.005842	.24543	.27307	.234	.280
vitCmed	8	.30663	.022303	.007885	.28798	.32527	.277	.337
vitChigh	8	.35263	.022978	.008124	.33342	.37183	.327	.387
IMOlw	8	.25038	.005344	.001889	.24591	.25484	.243	.261
IMOmed	8	.28700	.042732	.015108	.25128	.32272	.182	.309
IMOhigh	8	.29713	.009731	.003441	.28899	.30526	.276	.307
Total	56	.27473	.057086	.007628	.25944	.29002	.159	.387

## ANOVA

## Absorbance

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.156	6	.026	55.098	.000
Within Groups	.023	49	.000		
Total	.179	55			

## Multiple Comparisons

## Dependent Variable: Absorbance

## LSD

(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	vitClow	-.089125(*)	.010865	.000	-.11096	-.06729
	vitCmed	-.136500(*)	.010865	.000	-.15833	-.11467
	vitChigh	-.182500(*)	.010865	.000	-.20433	-.16067
	IMOlow	-.080250(*)	.010865	.000	-.10208	-.05842
	IMOmed	-.116875(*)	.010865	.000	-.13871	-.09504
	IMOhigh	-.127000(*)	.010865	.000	-.14883	-.10517
vitClow	kontrol	.089125(*)	.010865	.000	.06729	.11096
	vitCmed	-.047375(*)	.010865	.000	-.06921	-.02554
	vitChigh	-.093375(*)	.010865	.000	-.11521	-.07154
	IMOlow	.008875	.010865	.418	-.01296	.03071
	IMOmed	-.027750(*)	.010865	.014	-.04958	-.00592
	IMOhigh	-.037875(*)	.010865	.001	-.05971	-.01604
vitCmed	kontrol	.136500(*)	.010865	.000	.11467	.15833
	vitClow	.047375(*)	.010865	.000	.02554	.06921

	vitChigh	-.046000(*)	.010865	.000	-.06783	-.02417
	IMOIow	.056250(*)	.010865	.000	.03442	.07808
	IMOmed	.019625	.010865	.077	-.00221	.04146
	IMOhigh	.009500	.010865	.386	-.01233	.03133
vitChigh	kontrol	.182500(*)	.010865	.000	.16067	.20433
	vitClow	.093375(*)	.010865	.000	.07154	.11521
	vitCmed	.046000(*)	.010865	.000	.02417	.06783
	IMOIow	.102250(*)	.010865	.000	.08042	.12408
	IMOmed	.065625(*)	.010865	.000	.04379	.08746
	IMOhigh	.055500(*)	.010865	.000	.03367	.07733
IMOIow	kontrol	.080250(*)	.010865	.000	.05842	.10208
	vitClow	-.008875	.010865	.418	-.03071	.01296
	vitCmed	-.056250(*)	.010865	.000	-.07808	-.03442
	vitChigh	-.102250(*)	.010865	.000	-.12408	-.08042
	IMOmed	-.036625(*)	.010865	.001	-.05846	-.01479
	IMOhigh	-.046750(*)	.010865	.000	-.06858	-.02492
IMOmed	kontrol	.116875(*)	.010865	.000	.09504	.13871
	vitClow	.027750(*)	.010865	.014	.00592	.04958
	vitCmed	-.019625	.010865	.077	-.04146	.00221
	vitChigh	-.065625(*)	.010865	.000	-.08746	-.04379
	IMOIow	.036625(*)	.010865	.001	.01479	.05846
	IMOhigh	-.010125	.010865	.356	-.03196	.01171
IMOhigh	kontrol	.127000(*)	.010865	.000	.10517	.14883
	vitClow	.037875(*)	.010865	.001	.01604	.05971
	vitCmed	-.009500	.010865	.386	-.03133	.01233
	vitChigh	-.055500(*)	.010865	.000	-.07733	-.03367
	IMOIow	.046750(*)	.010865	.000	.02492	.06858
	IMOmed	.010125	.010865	.356	-.01171	.03196

\* The mean difference is significant at the .05 level.



**KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN  
RSUD Dr. SOETOMO SURABAYA**



**RUMAH SAKIT UMUM DAERAH  
Dr. SOETOMO**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
(" ETHICAL CLEARANCE ")**

**292 / Panke.KKE / IV / 2016**

**KOMITE ETIK RSUD Dr. SOETOMO SURABAYA TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA  
RENCANA PENELITIAN YANG DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA  
PENELITIAN DENGAN JUDUL :**

**Efek Pemberian Ekstrak Umbi Jalar Ungu (*Ipomoea Batatas L*) dan Vitamin C terhadap Proliferasi  
EPC Penderita Angina Pectoris Stabil "**

**RESENYA UTAMA : Luh Oliva Saraswati Suastika, dr**

**RESENYA LAIN : 1. Dr. dr. Yudi Her Oktaviono, Sp.JP (K), FIHA  
2. Prof. Dr. dr. Djoko Soemantri, Sp, JP (K), FIHA**

**INSTITUSI/LEMBAGA/TEMPAT PENELITIAN : RSUD Dr. Soetomo Surabaya**

**DINYATAKAN LAIK ETIK**

**SURABAYA, 07 APR 2016**  
**KETUA**  
**Prof. Hari Sukanto, dr., Sp.KK (K)**  
**NIP. 19471115 1973 03 1 001**