



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH PEMBERIAN JUS ANGGUR SELAMA DUA
MINGGU TERHADAP KADAR *NITRIC OXIDE* SERUM PADA
SUBYEK DENGAN KADAR KOLESTEROL TOTAL BATAS
TINGGI**

TESIS

**DYAH MARIA WAHYUNINGTYAS
0706171005**

**KEKHUSUSAN ILMU GIZI KLINIK
PROGRAM STUDI ILMU GIZI
PROGRAM PASCASARJANA FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS INDONESIA
JAKARTA, DESEMBER 2009**



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH PEMBERIAN JUS ANGGUR SELAMA DUA
MINGGU TERHADAP KADAR *NITRIC OXIDE* SERUM PADA
SUBYEK DENGAN KADAR KOLESTEROL TOTAL BATAS
TINGGI**

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar magister

DYAH MARIA WAHYUNINGTYAS

0706171005

**KEKHUSUSAN ILMU GIZI KLINIK
PROGRAM STUDI ILMU GIZI
PROGRAM PASCASARJANA FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS INDONESIA
JAKARTA, DESEMBER 2009**

LEMBAR PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh:

Nama : Dyah Maria Wahyuningtyas
NPM : 0706171005
Program Studi : Ilmu Gizi, Kekhususan Ilmu Gizi Klinik
Judul Tesis : Pengaruh Pemberian Jus Anggur Terhadap Kadar *Nitric Oxide* Serum Pada Subyek Dengan Kadar Kolesterol Total Batas Tinggi.

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister pada Kekhususan Ilmu Gizi Klinik, Program Studi Ilmu Gizi, Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I	: dr. Inge Permadhi, MS, SpGK	(..... Ryanti.....)
Pembimbing II	: dr. Ninik Mudjihartini, MS	(..... Ninik.....)
Penguji	: Prof. dra. Corrie Wawolumaya, PhD	(..... Corrie.....)
Penguji	: dr. Dyah Purnamasari, SpPD	(..... Dyah.....)
Penguji	: dr. Ani Retno Prijanti, MS	(..... Ani.....)
Penguji	: dr Lanny Lestiani, MSc, SpGK	(..... Lanny.....)

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 23 Desember 2009.

LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun rujukan,
telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Dyah Maria Wahyuningtyas

NPM : 0706171005

Tanda tangan 

Tanggal : 16 Desember 2009

**LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

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

Nama : Dyah Maria Wahyuningtyas
NPM : 0706171005
Program Studi : Ilmu Gizi, Kekhususan Ilmu Gizi Klinik
Fakultas : Kedokteran
Jenis Karya : Tesis

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

PENGARUH PEMBERIAN JUS ANGGUR TERHADAP KADAR *NITRIC OXIDE* SERUM PADA SUBYEK DENGAN KADAR KOLESTEROL TOTAL BATAS TINGGI

Beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini, Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/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 Jakarta
Pada tanggal 26 Desember 2009
Yang menyatakan,



(Dyah Maria Wahyuningtyas)

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Kuasa atas berkat dan rahmatnya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan tesis ini.

Penelitian ini merupakan suatu uji klinik untuk menilai pengaruh jus anggur terhadap kadar NO dan kolesterol total serum yang dilakukan pada anggota Polri dan PNS beserta pasangannya yang tinggal di asrama Polri Cipinang dengan kadar kolesterol total batas tinggi, dan berusia 25 – 44 tahun.

Tersusunnya tesis ini tidak lepas dari bimbingan dan arahan dari dosen pembimbing dan staf pengajar Departemen Ilmu Gizi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Untuk itu, penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada dr. Inge Permadhi, MS. SpGK sebagai pembimbing I yang dengan kesabaran, ketekunan, dan ketelitiannya selalu mendampingi penulis dalam menyusun tesis dari semenjak seminar tinjauan pustaka hingga selesainya penyusunan tesis ini.

Ucapan terima kasih dan penghargaan juga penulis sampaikan kepada dr. Ninik Mudjihartini, MS. sebagai pembimbing II atas bimbingan dan arahnya, karena meskipun di tengah jadwal beliau yang padat, masih meluangkan waktunya untuk membimbing penulis dalam menyelesaikan tesis ini.

Ucapan terima kasih kepada dr. Victor Tambunan, MS, SpGK selaku Ketua Departemen Ilmu Gizi, dr. Lanny Lestiani, MSc, SpGK selaku Ketua Program studi Ilmu Gizi, dan dr. Erwin Christianto, Mgizi, SpGK dan dr Diana Sunardi, Mgizi selaku Ketua Kekhususan Ilmu Gizi Klinik beserta seluruh staf pengajar di Departemen Ilmu Gizi, atas bimbingan dan dukungan yang telah diberikan sejak awal menjalani pendidikan hingga saat ini.

Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada seluruh karyawan Departemen Ilmu Gizi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dan seluruh peserta program magister Kekhususan Ilmu Gizi Klinik, khususnya angkatan 2007 atas bantuan dan dukungannya, terutama kepada dr. Niken Manohara, karena atas dukungan dan referensinya memungkinkan penulis untuk melakukan penelitian

dengan subyek anggota Polri dan keluarganya di Asrama Polri Cipinang. Juga ucapan terimakasih kepada Dita, Maria, dan Ade, sahabat-sahabat yang selalu memberi dukungan dan semangat selama proses penyusunan tesis.

Terima kasih yang tidak terhingga kepada seluruh subyek penelitian yang telah mengikuti seluruh rangkaian penelitian. Terima kasih kepada staf laboratorium Prodia dan semua pihak yang telah membantu selama proses pelaksanaan penelitian.

Penulis juga menghaturkan terima kasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada kedua orang tua yang dengan tulus dan ikhlas selalu memberikan dukungan dan bantuan yang tak terhingga selama proses penyusunan tesis ini, juga kepada suami tercinta, Suarno Pranoto, yang telah dengan setia mendampingi, memberikan dukungan dan doa untuk keberhasilan penulis menyelesaikan pendidikan. Kepada anak-anakku, L. Arsa Pandega, Gemma Larasati P., dan Maria Harumi D. yang selalu menjadi sumber kebahagiaan dan inspirasi penulis dalam menjalani dan menyelesaikan pendidikan.

Akhir kata, semoga Tuhan Yang Maha Kuasa berkenan melimpahkan berkat dan rahmatnya kepada semua pihak yang telah mendukung dan membantu. Dan semoga tesis ini bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Jakarta, Desember 2009

Penulis

ABSTRAK

Nama : Dyah Maria Wahyuningtyas
Program studi : Ilmu Gizi, Kekhususan Ilmu Gizi Klinik
Judul : Pengaruh Pemberian Jus Anggur Selama Dua Minggu Terhadap Kadar NO Serum Pada Subyek Dengan Kadar Kolesterol Total Batas Tinggi

Tujuan penelitian ini adalah diketahuinya pengaruh pemberian jus anggur 300 gram per hari selama dua minggu terhadap kadar NO serum laki-laki dan perempuan dengan kadar kolesterol total batas tinggi. Penelitian ini merupakan sebuah *field trial*, membandingkan 18 subyek dalam kelompok yang mendapatkan jus anggur disertai penyuluhan TLC (P) dengan 17 subyek dalam kelompok yang hanya mendapatkan penyuluhan TLC (K). Subyek yang memenuhi kriteria penelitian dibagi menjadi dua kelompok dengan randomisasi sederhana. Data yang diambil meliputi usia, jenis kelamin, riwayat hiperkolesterolemia dalam keluarga, aktivitas fisik, indeks massa tubuh (IMT), asupan energi, lemak, kolesterol, serat, dan polifenol dengan *food record*. Pemeriksaan kadar kolesterol total dan NO serum dilakukan di awal dan akhir perlakuan. Analisis data menggunakan uji t tidak berpasangan dan uji Mann Whitney dengan batas kemaknaan 5%. Sebanyak 18 subyek pada kelompok P dan 14 subyek pada kelompok K, dengan rerata usia $35,57 \pm 5,20$ tahun mengikuti penelitian secara lengkap. Indeks aktivitas fisik subyek kedua kelompok termasuk di bawah rata-rata. Data awal tidak didapatkan perbedaan bermakna ($p > 0,05$). Setelah dua minggu perlakuan, didapatkan persentase asupan energi terhadap kebutuhan energi total termasuk kategori cukup pada kelompok perlakuan dan kurang pada kontrol. Asupan lemak total dan kolesterol kedua kelompok adalah tergolong cukup. Asupan serat tergolong kurang. Terdapat perbedaan bermakna asupan polifenol pada kedua kelompok selama perlakuan ($p < 0,05$). Terdapat peningkatan kadar NO serum sesudah perlakuan pada kedua kelompok yang tidak berbeda bermakna ($p > 0,05$), bahkan terdapat penurunan kadar kolesterol total serum pada kedua kelompok sesudah perlakuan meskipun tidak berbeda bermakna ($p > 0,05$) dan masih dalam kategori batas tinggi. Pemberian jus anggur 300 gram per hari tidak didapatkan perbedaan bermakna peningkatan kadar NO serum antara kelompok perlakuan dan kontrol.

Kata kunci :

Jus anggur, polifenol, kolesterol total serum, NO serum.

ABSTRACT

Name : Dyah Maria Wahyuningtyas
Study Program: Nutrition, Clinical Nutrition
Title : Effect of Grape Juice Consumption for Two Weeks on Serum
NO Level in Subjects with Borderline High Serum Total
Cholesterol Level

The aim of this study was to investigate the effect of grape juice (that made from 300 grams of grapes per day) during two weeks on serum NO level in male and female subjects with borderline high total cholesterol level. The study was a field trial. Thirty five subjects were selected using certain criteria and randomly (simple randomization) divided into two groups. The treatment group (n=18) received grape juice and nutrition counseling; the control group (n=17) received nutrition counseling. Data obtained directly from the subjects were age, gender, history of hypercholesterolemia in subject's family, physical activity, and body mass index, intake of energy, fat, cholesterol, fiber and polyphenol using food record. Laboratory findings of serum NO level and total cholesterol level were done before and after intervention. For statistical analysis, unpaired t-test and Mann Whitney were used with the level of significance was 5%. Eighteen subjects in the treatment group and fourteen subjects in the control group completed the study and analyzed. Mean of age was 35.57 ± 5.20 years old. The physical activity index of both groups were low. The characteristics of the two groups were closely matched at base line ($p > 0.05$). After two weeks intervention, subjects' energy consumed in the treatment group achieved the recommended diet, while in the control group was below. The average intake of total fat and cholesterol in both groups achieved the recommended diet, but the fiber intake were below. The average intake of polyphenol in the treatment group was increased significantly than the control group ($p < 0.05$) during intervention period. There were increased of serum NO level after treatment in both groups, but not statistically significant ($p > 0.05$). There were decreased on serum total cholesterol level in both groups, although not statistically significant ($p > 0.05$). The effect of grape juice for two weeks did not significantly increase serum NO level in the treatment group.

Keywords:

Grape juice, polyphenol, serum NO level, serum total cholesterol

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
LEMBAR PERNYATAAN PUBLIKASI	iv
KATA PENGANTAR	v
ABSTRAK	vii
<i>ABSTRACT</i>	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SINGKATAN	xiv
1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Hipotesis	3
1.4. Tujuan Penelitian	4
1.5. Manfaat Penelitian	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Anggur	6
2.2. Polifenol dalam anggur	7
2.3. Hiperkolesterolemia	14
2.4. Disfungsi endotel pembuluh darah	15
2.5. Pengaruh Anggur terhadap kadar kolesterol darah dan fungsi endotel pembuluh darah	21
2.6. Kerangka teori	24
2.7. Kerangka konsep	25
3. METODE PENELITIAN	26
3.1. Rancangan Penelitian	26
3.2. Tempat dan waktu penelitian	26
3.3. Bahan penelitian	26
3.4. Asupan makanan yang diberikan	29
3.5. Instrumen pengumpulan data	29
3.6. Cara kerja	31
3.7. Identifikasi variabel	36
3.8. Manajemen dan Analisis Data	36
3.9. Batasan operasional	37
3.10. Kerangka operasional	42
3.11. Variabel yang diteliti dan indikatornya	43

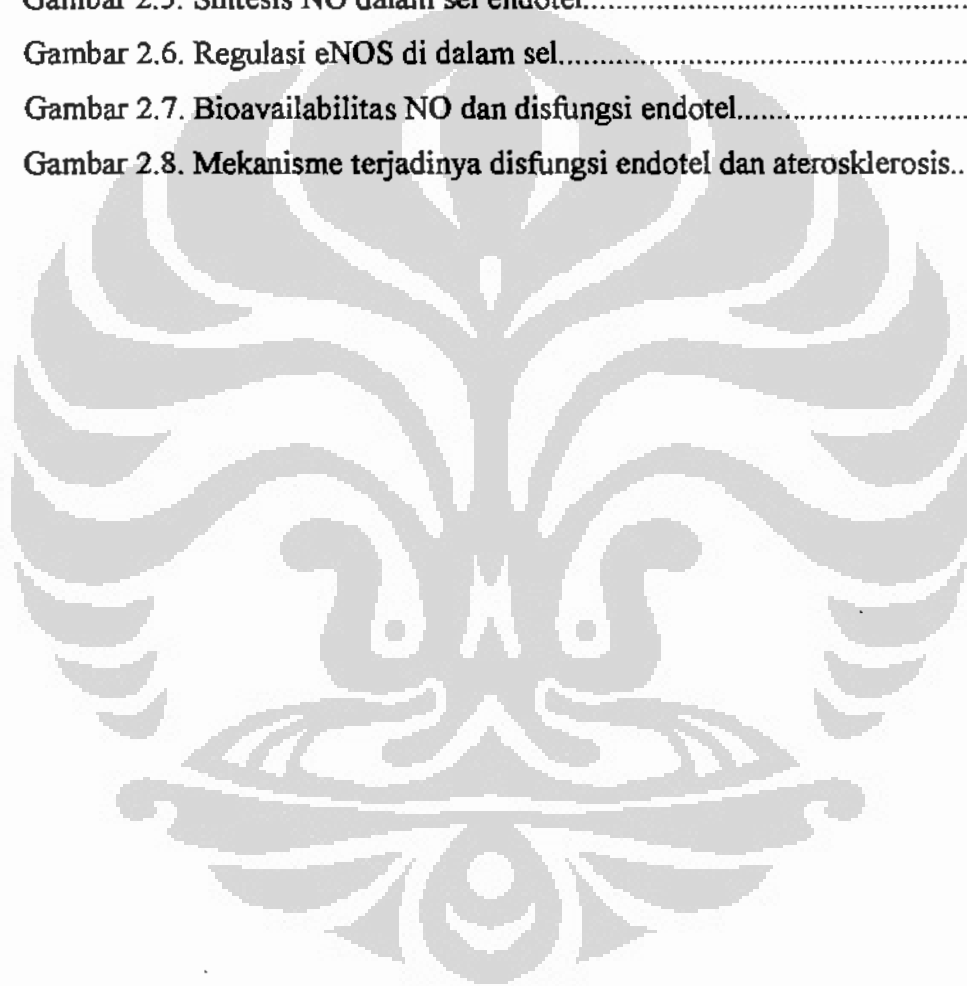
4. HASIL PENELITIAN	44
4.1. Seleksi Subyek Penelitian	44
4.2. Karakteristik Subyek Penelitian	45
4.3. Indeks Massa Tubuh (IMT)	45
4.4. Asupan Energi dan Zat Gizi	46
4.5. Kadar Kolesterol Total Serum	47
4.6. Kadar NO serum	48
5. PEMBAHASAN	49
5.1. Keterbatasan Penelitian	49
5.2. Seleksi Subyek Penelitian	50
5.3. Karakteristik Subyek Penelitian	51
5.4. Asupan Energi dan Zat Gizi	54
5.5. Kadar Kolesterol Total Serum	56
5.6. Kadar <i>Nitric oxide</i> (NO) serum	58
6. RINGKASAN, KESIMPULAN DAN SARAN	60
6.1. Ringkasan	60
6.2. Kesimpulan	61
6.3. Saran	62
SUMMARY, CONCLUSIONS, AND RECOMMENDATIONS	63
DAFTAR REFERENSI	66
MANUSCRIPT	72
LAMPIRAN-LAMPIRAN	81

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Kandungan Nutrisi Dalam 100 Gram Anggur	6
Tabel 2.2. Kandungan Polifenol Dalam 100 gram Bahan Makanan Sumber ..	11
Tabel 3.1. Interpretasi indeks aktivitas fisik.....	38
Tabel 3.2. Klasifikasi status gizi.....	38
Tabel 3.3. Klasifikasi asupan energi	39
Tabel 3.4. Klasifikasi asupan lemak	40
Tabel 3.5. Klasifikasi asupan kolesterol	40
Tabel 3.6. Klasifikasi asupan serat	40
Tabel 3.7. Interpretasi Kadar NO serum	41
Tabel 3.8. Indikator Matriks	43
Tabel 4.1. Karakteristik Subyek Penelitian	45
Tabel 4.2. Tabel IMT Sebelum dan Sesudah Perlakuan	46
Tabel 4.3. Asupan Energi, Lemak, Kolesterol, Serat dan Polifenol	47
Tabel 4.4. Kadar NO serum Sebelum dan Sesudah Perlakuan	48
Tabel 4.5. Tabel Kadar Kolesterol Total Serum Sebelum dan Sesudah Perlakuan	48

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Struktur kimia empat kelas polifenol	8
Gambar 2.2. Jalur pencernaan polifenol dalam tubuh	9
Gambar 2.3. Metabolisme polifenol	10
Gambar 2.4. Buah anggur dan komposisi dalam kulit, daging, dan biji buah	13
Gambar 2.5. Sintesis NO dalam sel endotel.....	17
Gambar 2.6. Regulasi eNOS di dalam sel.....	17
Gambar 2.7. Bioavailabilitas NO dan disfungsi endotel.....	19
Gambar 2.8. Mekanisme terjadinya disfungsi endotel dan aterosklerosis.....	19



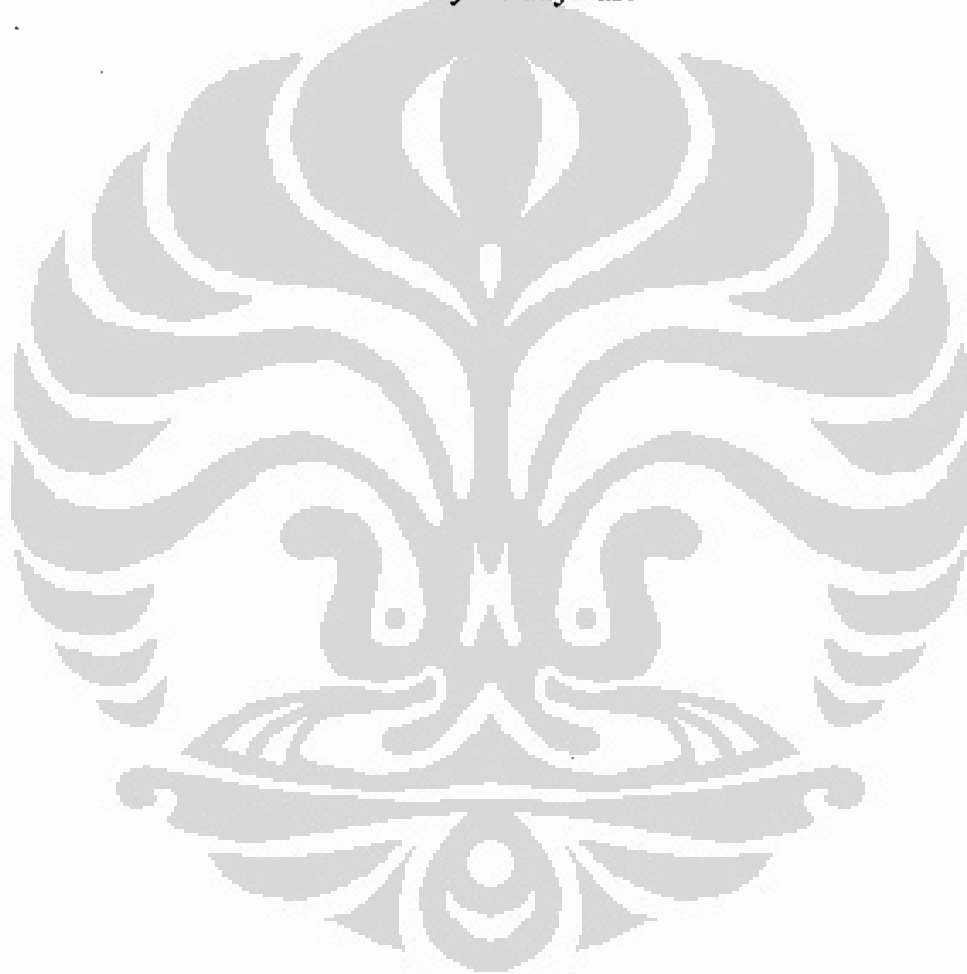
DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	: lembar persetujuan komisi etik.....	81
Lampiran 2	:	82
Formulir A1	: lembar informasi penelitian untuk kelompok kontrol.....	82
Formulir A2	: lembar informasi penelitian untuk kelompok perlakuan...	83
Formulir A3	: lembar persetujuan subyek.....	84
Formulir A4	: lembar seleksi subyek.....	85
Formulir A5	: lembar data karakteristik subyek.....	86
Lampiran 3	:	87
Formulir B1	: lembar catatan asupan makanan (<i>food record</i>).....	87
Formulir B2	: lembar keluhan dan kepatuhan subyek.....	88
Lampiran 4	:	89
Formulir C1	: lembar data pemeriksaan antropometri.....	89
Formulir C2	: lembar data pemeriksaan laboratorium.....	90
Lampiran 5	: prosedur randomisasi sederhana.....	91
Lampiran 6	: contoh menu diet seimbang.....	92
Lampiran 7	: pembatasan konsumsi makanan pada masa <i>run-in</i> dan perlakuan.....	93
Lampiran 8	: lembar indeks aktivitas fisik.....	94
Lampiran 9	: prosedur pemeriksaan kadar kolesterol total serum.....	98
Lampiran 10	: prosedur pemeriksaan kadar NO serum.....	100
Lampiran 11	: lembar prosedur pembuatan jus anggur.....	107

DAFTAR SINGKATAN

AF	: Aktivitas Fisik
BB	: Berat Badan
COMT	: <i>Catechol-O-Methyltransferase</i>
CBG	: <i>Cytocolic β-Glucosidase</i>
eNOS	: <i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i>
FAD	: <i>Flavin-Adenin Dinucleotide</i>
FMN	: <i>Flavin-Monomucleotide</i>
FMD	: <i>Flow Mediated Dilatation</i>
GMPc	: <i>Cyclic Guanosine Monophosphate</i>
GTP	: <i>Guanosine Triphosphate</i>
GSH	: Glutation
H ₄ B	: <i>Tetrahydrobiopterin</i>
HUVECs	: <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
IAF	: Indeks Aktivitas Fisik
IMT	: Indeks Massa Tubuh
iNOS	: <i>Inducible NOS</i>
KEB	: Kebutuhan Energi Basal
KET	: Kebutuhan Energi Total
L-NA	: N ^o -nitro -arginin
LPH	: <i>Lactase Phlorizin Hydrolase</i>
mRNA	: <i>Messenger Rybomucleic Acid</i>
NCEP-ATP III	: <i>National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III</i>
NO	: <i>Nitric Oxide</i>
NOS	: <i>Nitric Oxide Synthase</i>
nNOS	: neuronal NOS
NADPH	: <i>Nicotinamide Adenine Dimucleotide Phosphate</i>
NF κ B	: <i>Nuclear Factor Kappa B</i>
PI 3-kinase	: Fosfatidilinositol 3-kinase

PKV	: Penyakit kardiovaskuler
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SOD	: <i>Superoxide Dismutase</i>
SULT	: <i>Sulfotransferase</i>
SKRT	: Survei Kesehatan Rumah Tangga
TB	: Tinggi Badan
TLC	: <i>Therapeutic Life Style Changes</i>
UDPGT	: <i>UDP Glucuronosyl Transferase</i>



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar belakang

Penyakit kardiovaskuler (PKV) telah menjadi epidemi global dan penyebab kematian tertinggi. Berdasarkan Profil Kesehatan Indonesia tahun 2006, PKV menjadi penyebab kematian utama di Indonesia.^{1,2}

Peningkatan kadar kolesterol merupakan salah satu faktor risiko terjadinya PKV.³ Survey Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) 2004 menunjukkan prevalensi penduduk dengan kadar kolesterol total batas tinggi (200-239 mg/dL) pada usia 25-34 tahun sebesar 9,3%, usia 35-44 tahun sebesar 10,8%, kemudian meningkat sejalan dengan bertambahnya usia dan tertinggi pada usia 55-64 tahun yaitu 15,5%.⁴ Suatu studi prospektif yang dilakukan pada subyek berusia 25-47 tahun mendapatkan bahwa kejadian PKV pada subyek dengan kadar kolesterol total <190 mg/dL sebesar 18,5%, menjadi 22,4% pada subyek dengan kadar kolesterol total 190-208 mg/dL, dan makin meningkat menjadi 37,7% pada subyek dengan kadar kolesterol >209 mg/dL, sehingga disimpulkan bahwa peningkatan kadar kolestrol total dapat digunakan untuk memprediksi terjadinya PKV.⁵

Peningkatan kadar kolesterol darah yang dipengaruhi oleh faktor genetik, usia, jenis kelamin, obesitas, dan asupan makanan, dapat menyebabkan peningkatan *reactive oxygen species* (ROS), yang mengakibatkan penurunan aktivitas *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS) dan bioavailabilitas *nitric oxide* (NO).⁶ Penurunan bioavailabilitas NO tersebut menyebabkan terjadinya disfungsi endotel pembuluh darah.³ Disfungsi endotel akan berlanjut menjadi aterogenesis dan aterosklerosis yang merupakan patogenesis utama PKV. Faktor lain yang dapat menyebabkan terjadinya disfungsi endotel adalah hipertensi, hiperglikemia, penyakit kronis, kebiasaan merokok dan rendahnya aktivitas fisik.^{3,6,7}

Disfungsi endotel pembuluh darah bersifat reversibel, sehingga dengan memperbaiki fungsi endotel maka risiko terjadinya PKV dapat diturunkan.³ Beberapa penelitian mendapatkan bahwa dengan memperbaiki faktor risiko PKV

seperti hiperkolesterolemia, terjadi juga peningkatan bioavailabilitas NO yang menunjukkan perbaikan fungsi endotel pembuluh darah.^{8,9} *National Cholesterol Education Program (NCEP) Adult Treatment Panel (ATP) III 2002*¹⁰ merekomendasikan modifikasi gaya hidup yang disebut *therapeutic life style changes (TLC)* untuk menurunkan risiko terjadinya PKV pada individu dengan kadar kolesterol batas tinggi. Yang dimaksud dengan TLC adalah mempertahankan berat badan normal, melakukan olahraga teratur, membatasi konsumsi energi, lemak dan kolesterol, serta meningkatkan konsumsi buah dan sayur sebagai sumber serat dan antioksidan.^{3,10,11} Dalam beberapa penelitian tentang pemberian konseling diet dan olah raga¹² serta antioksidan^{8,13} terbukti memperbaiki bioavailabilitas NO.

Polifenol yang banyak terkandung dalam anggur, termasuk produk olahannya, diketahui juga dapat memperbaiki fungsi endotel pembuluh darah.^{14,15} Hal ini disebabkan karena polifenol mempunyai peran sebagai antioksidan^{8,16} dan dapat meningkatkan aktivitas enzim eNOS¹⁷ sehingga meningkatkan bioavailabilitas NO.

Penelitian Castilla dkk¹⁸ yang memberikan jus anggur 100 mL/hari selama 14 hari berhasil memperbaiki fungsi endotel pembuluh darah subyek penelitian. Matsuo dkk¹⁹ mendapatkan bahwa polifenol dalam *red wine* dapat meningkatkan secara bermakna kadar NO serum subyek penelitian 30 menit pasca konsumsi. Begitu pula dengan Freedman dkk²⁰ yang memberikan jus anggur 7 mL/kg BB/hari pada subyek sehat dan Stein dkk²¹ yang memberikan jus anggur 8 mL/kg BB/hari pada subyek dislipidemia selama 14 hari mendapatkan bahwa polifenol dalam jus anggur dapat memperbaiki bioavailabilitas NO. Namun sebaliknya Albers dkk²² yang memberikan jus anggur sebanyak 7 mL/kg BB/hari selama 14 hari pada subyek dislipidemia ternyata tidak menunjukkan peningkatan bermakna bioavailabilitas NO.

Berdasarkan hal-hal di atas, maka dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh jus anggur terhadap kadar NO serum pada subyek dengan kadar kolesterol total batas tinggi, yang dilakukan pada anggota Polri dan PNS beserta pasangannya yang tinggal di asrama Polri Cipinang, dengan membandingkan dua kelompok yaitu kelompok perlakuan yang mendapatkan jus anggur dari 300 gram buah anggur segar

satu kali per hari selama 14 hari disertai penyuluhan TLC dengan kelompok kontrol yang hanya mendapatkan penyuluhan TLC. Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian “Efek jus anggur terhadap kadar kolesterol LDL pada subyek dengan kadar kolesterol total batas tinggi”.²³

1.2. Rumusan Masalah

1.2.1. Identifikasi Masalah

1. Penyakit kardiovaskuler merupakan penyebab kematian tertinggi, dan salah satu faktor risikonya adalah peningkatan kadar kolesterol darah.
2. Kadar kolesterol meningkat sesuai dengan penambahan usia.
3. Hiperkolesterolemia menyebabkan terjadinya disfungsi endotel yang ditandai dengan penurunan bioavailabilitas NO.
4. Polifenol dapat membantu memperbaiki fungsi endotel pembuluh darah.

1.2.2. Perumusan Masalah

Berdasarkan uraian tersebut di atas, dapat dirumuskan pertanyaan sebagai berikut:

Apakah terdapat perbedaan bermakna perubahan kadar NO serum antara anggota Polri dan PNS beserta pasangannya di asrama Polri Cipinang dengan kadar kolesterol total batas tinggi yang mendapatkan jus anggur dari 300 gram buah anggur segar satu kali per hari selama 14 hari disertai penyuluhan TLC dibandingkan bila hanya mendapatkan penyuluhan TLC?

1.3. Hipotesis

Terdapat perbedaan bermakna perubahan kadar NO serum antara anggota Polri dan PNS beserta pasangannya dengan kadar kolesterol total batas tinggi yang mendapatkan jus anggur dari 300 gram buah anggur segar satu kali per hari selama 14 hari disertai penyuluhan TLC dibandingkan bila hanya mendapatkan penyuluhan TLC.

1.4. Tujuan Penelitian

1.4.1. Tujuan Umum

Pemberian jus anggur dari buah anggur segar diharapkan dapat memperbaiki fungsi endotel pembuluh darah sehingga dapat menurunkan risiko terjadinya penyakit kardiovaskuler, menurunkan angka morbiditas dan mortalitas.

1.4.2. Tujuan Khusus

1. Diketahuinya karakteristik subyek penelitian berdasarkan usia, jenis kelamin, riwayat hiperkolesterolemia dalam keluarga, dan aktivitas fisik pada kelompok perlakuan dan kontrol.
2. Diketahuinya status gizi berdasarkan indeks massa tubuh (IMT) sebelum dan sesudah perlakuan pada kelompok perlakuan dan kontrol.
3. Diketahuinya sebaran asupan energi, lemak, kolesterol, serat, dan polifenol sebelum dan selama perlakuan dengan metode *food record* 2 x 24 jam pada kelompok perlakuan dan kontrol.
4. Diketahuinya kadar NO serum sebelum dan sesudah perlakuan pada kelompok perlakuan dan kontrol.

1.5. Manfaat Penelitian

1.5.1. Manfaat untuk subyek penelitian

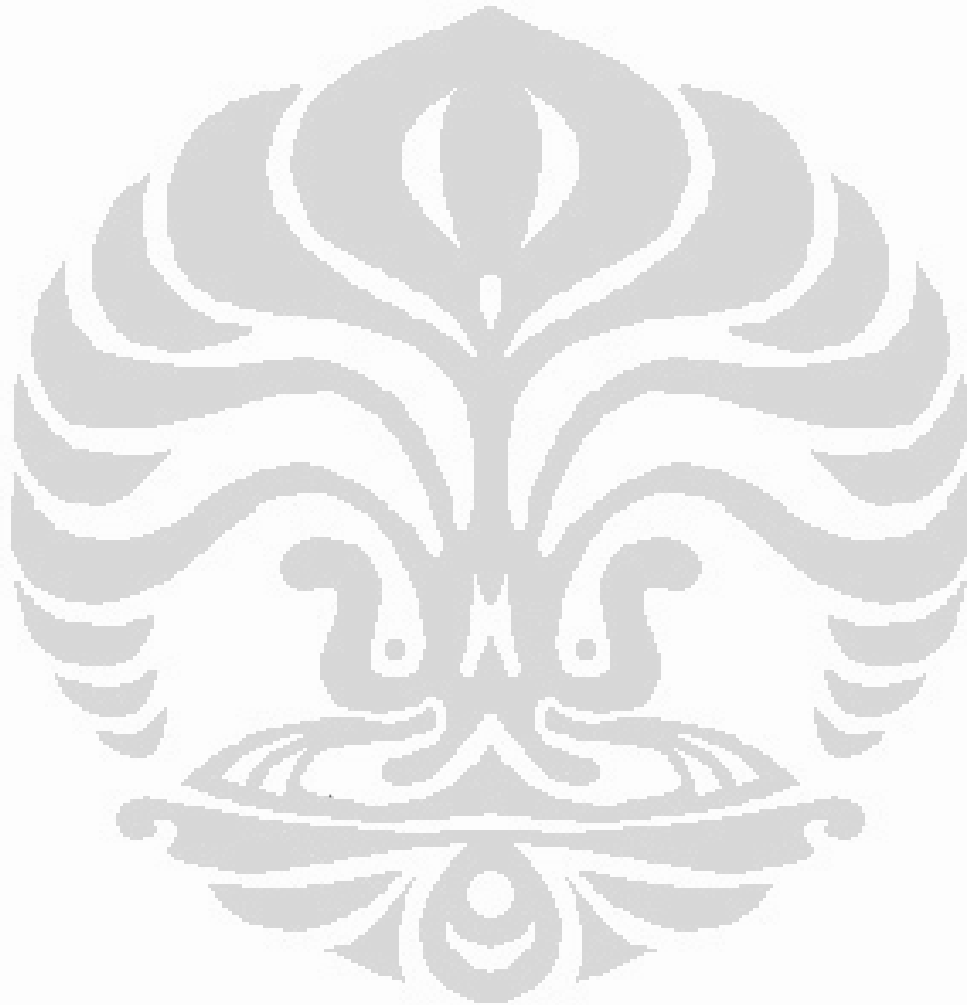
Penelitian ini diharapkan dapat menurunkan risiko terjadinya penyakit kardiovaskuler pada subyek penelitian.

1.5.2. Manfaat untuk institusi

Penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan mengenai pengaruh pemberian jus anggur terhadap kadar NO serum, serta diharapkan dapat menjadi data dasar bagi penelitian selanjutnya.

1.5.3. Manfaat untuk peneliti

Melalui penelitian ini diharapkan peneliti dapat menerapkan dan memanfaatkan ilmu yang didapatkan selama kuliah, serta dapat menjadi sarana untuk melatih cara berpikir dan membuat penelitian berdasarkan metodologi penelitian yang baik dan benar.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Anggur

Tanaman anggur termasuk dalam famili *vitaceae*, mempunyai dua genus yaitu *vitis* dan *muscadinia*. *Vitis* mempunyai banyak spesies yang telah dibudidayakan, salah satu yang terkenal adalah *vitis vinifera* yang berasal dari wilayah sebelah Selatan antara Laut Kaspia dan Laut Hitam di Asia Kecil, dan saat ini hampir semua varietas anggur yang terkenal berasal dari spesies ini. Tanaman anggur spesies *vitis vinifera* mulai masuk ke Indonesia pada abad 17.²⁴

Di pasaran, anggur selain tersedia dalam bentuk buah segar juga tersedia dalam berbagai bentuk produk olahan, seperti jus, sari buah, *wine*, selai, kismis, dan ekstrak biji anggur.²⁵

2.1.1. Kandungan nutrisi dalam anggur

Buah anggur mengandung berbagai nutrisi seperti tampak pada tabel 2.1.

Tabel 2.1. Kandungan Nutrisi Dalam 100 Gram Anggur

Nutrisi	Kandungan dalam 100 gram	Nutrisi	Kandungan dalam 100 gram
Air	80,54 gr	Natrium	2 mg
Energi	69 kkal	Besi	0,36 mg
Karbohidrat	18,10 gr	Asam askorbat	10,80 mg
Protein	0,72 gr	Thiamin	0,069 mg
Serat	0,9 gr	Niasin	0,188 mg
Gula	15,48 gr	Vitamin B6	0,086 mg
Kalium	191 mg	Beta karoten	39 mcg
Fosfor	20 mg	Vitamin A	66 IU
Kalsium	10 mg	Alfa tokoferol	0,19 mg
Magnesium	7 mg	Polifenol	196 mg

Sumber: telah diolah kembali dari Brat dkk²⁶

Beberapa literatur melaporkan bahwa konsumsi anggur dan produk olahannya dapat mencegah dan menurunkan kejadian PKV, kanker, serta penyakit degeneratif seperti demensia dan alzheimer. Efek ini diduga disebabkan karena kandungan polifenol yang tinggi dalam anggur, yang mempunyai kapasitas antioksidan lebih tinggi dibanding antioksidan lain seperti vitamin C dan alfa tokoferol.^{8,27,28}

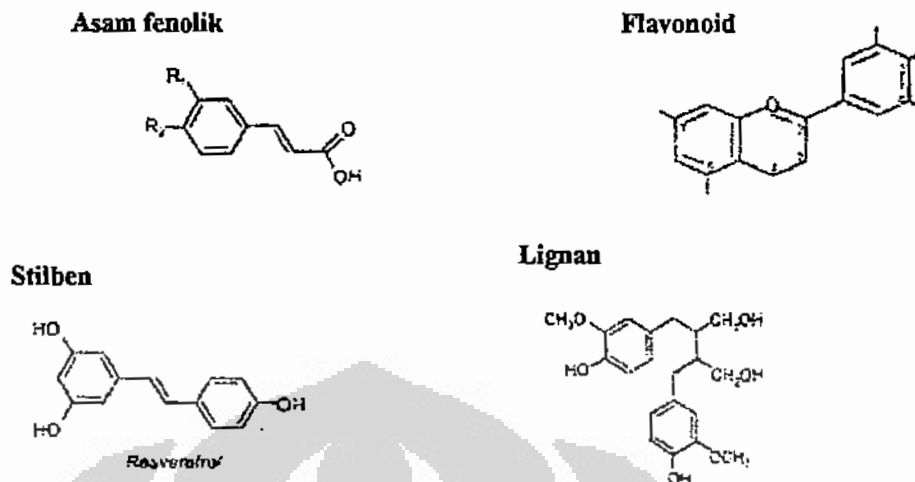
2.2. Polifenol dalam anggur

2.2.1. Definisi, klasifikasi dan struktur kimia polifenol

Polifenol adalah suatu senyawa hasil metabolit sekunder dalam tanaman yang merupakan pelindung tanaman dari ultraviolet dan patogen, juga berperan dalam memberi warna dan rasa buah maupun makanan atau minuman produk olahannya.^{29,30}

Lebih dari 4000 macam senyawa polifenol terdapat pada tanaman dan sangat bervariasi kuantitasnya dalam tiap jenis tanaman. Variasi polifenol tersebut antara lain dipengaruhi genetik tanaman, kondisi lingkungan, dan tahap pertumbuhan serta kematangan buah.^{25,30}

Polifenol dibagi menjadi beberapa kelas berdasarkan sifat rangka karbonnya yaitu asam fenolik, flavonoid, stilben (resveratrol), dan lignan (gambar 2.1).²⁸ Flavonoid merupakan polifenol terbanyak dalam bahan makanan sumber, dibagi menjadi 6 subkelas yaitu flavonol, flavon, flavanon, isoflavon, antosianin, dan flavanol yang mempunyai bentuk monomer yaitu katekin dan bentuk oligomer yaitu proantosianidin.^{29,31} Perbedaan struktur kimia polifenol menentukan kecepatan dan jumlah yang dapat diabsorpsi, serta bioavailabilitasnya.²⁸



Gambar 2.1. Struktur kimia empat kelas polifenol

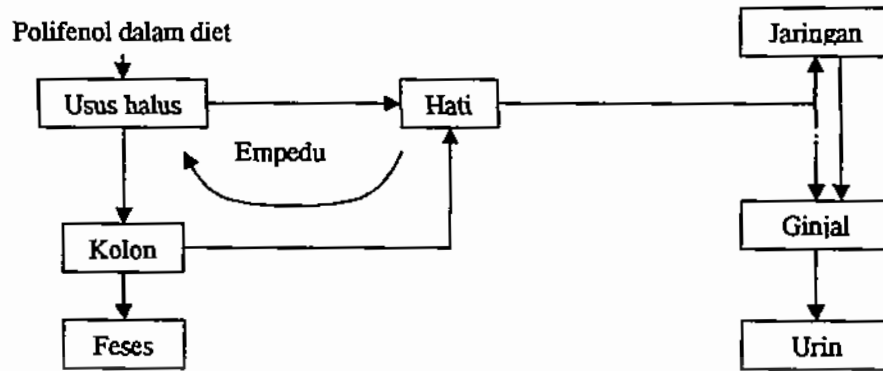
Sumber: telah diolah kembali dari Scalbert dkk²⁸

2.2.2. Bioavailabilitas, pencernaan, dan metabolisme polifenol

Polifenol dalam bahan makanan atau minuman banyak terdapat dalam bentuk terkonjugasi. Setelah dikonsumsi, ikatan gula pada polifenol bentuk terkonjugasi (misalnya konjugasi dengan glikosida) akan mengalami hidrolisis oleh sel usus, dan mikroflora di kolon. Proses hidrolisis tersebut dikatalisis oleh enzim *Cytocolic β -Glucosidase* (CBG) atau *Lactase Phlorizin Hydrolase* (LPH).²⁸

Polifenol bentuk bebas (aglikon) diabsorpsi oleh sel usus halus secara difusi pasif. Sedangkan polifenol yang tidak dapat diabsorpsi (masih dalam bentuk terkonjugasi) akan menuju ke kolon, dan oleh mikroflora kolon dihidrolisis menjadi senyawa yang lebih sederhana seperti asam fenolik.²⁸

Polifenol di dalam sel usus akan mengalami konjugasi dengan metil atau asam glukoronat, kemudian masuk vena porta menuju hati. Polifenol yang masuk ke dalam hati juga mengalami konjugasi lebih lanjut dengan metil, asam glukoronat, dan grup sulfat. Proses konjugasi tersebut dikatalisis oleh beberapa macam enzim tergantung senyawa konjugasinya, misalnya proses konjugasi dengan metil dikatalisis oleh enzim *Catechol-O-Methyltransferase* (COMT), dengan asam glukoronat dikatalisis oleh enzim *UDP Glucuronosyl Transferase* (UDPGT), dan dengan sulfat dikatalisis oleh enzim *Sulfotransferase* (SULT).^{28,32,33}

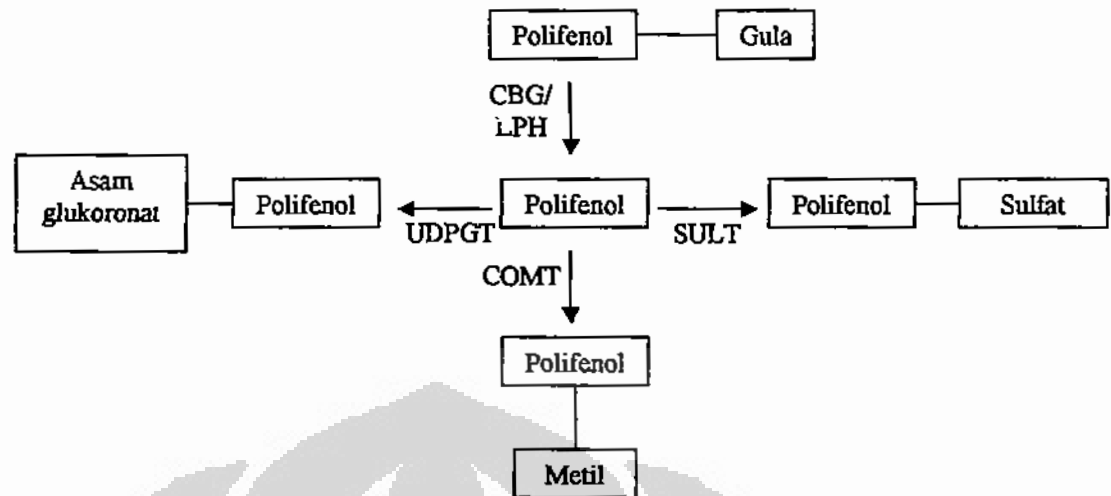


Gambar 2.2. Jalur pencernaan polifenol dalam tubuh

Sumber: telah diolah kembali dari Scalbert dkk²⁸

Polifenol yang telah mengalami konjugasi di hati akan masuk ke sirkulasi dan disebarkan ke jaringan, namun sebagian akan diekskresi bersama empedu ke kolon, kemudian bersama dengan polifenol hasil hidrolisis mikroflora usus akan masuk ke dalam siklus enterohepatik. Sisa metabolisme polifenol kemudian akan diekskresi melalui urin dan feses, dalam bentuk terkonjugasi.^{28,32,33}

Konsumsi bahan makanan yang mengandung polifenol dalam jumlah biasa seperti diet sehari-hari, kadar polifenol yang terdeteksi di plasma tidak pernah melebihi satu mikro mol, dan konsentrasi maksimal di plasma akan terjadi setelah satu sampai dua jam pasca konsumsi. Ekskresi polifenol di urin ditemukan dalam bentuk terkonjugasi, terjadi dalam 24 jam pasca konsumsi, sebesar 0,3% sampai 43% dari jumlah yang dikonsumsi.^{28, 32}



Gambar 2.3. Metabolisme polifenol

Keterangan:

CBG : *Cytocolic b-Glucosidase*

LPH : *Lactase Phlorizin Hydrolase*

COMT : *Catechol-O-Methyltransferase*

UDPGT : *UDP Glucuronosyl Transferase*

SULT : *Sulfotransferase*

Sumber: telah diolah kembali dari Scalbert dkk²⁸

2.2.3. Bahan makanan sumber polifenol

Bahan makanan sumber polifenol adalah buah dan sayur. Kandungan polifenol dalam buah lebih tinggi dibandingkan sayur, bahkan lebih tinggi dibandingkan kandungan antioksidan lainnya. Misalnya kandungan vitamin C dalam jeruk hanya sekitar 40% dibandingkan kandungan polifenolnya.²⁸ Minuman seperti kopi, teh, jus buah, serta *wine* juga merupakan sumber polifenol (tabel 2.2).^{26,29}

Tabel 2.2. Kandungan Polifenol Dalam 100 gram Bahan Makanan Sumber (mg)

Bahan makanan sumber	Kandungan polifenol (mg)	Bahan makanan sumber	Kandungan polifenol (mg)
Buah		Seledri	84,7
Strawberi	263,8	Bawang merah	76,1
Leci	222,3	Asparagus	14,5
Anggur	196,0	Terong	65,5
Aprikot	179,8	Bawang putih	59,4
Apel	179,1	Lobak	54,7
Kurma	99,3	Selada	35,6
Cherry	94,3	Bit	38,4
Pir	69,2	Kacang polong	36,7
Mangga	68,1	Bawang perai	32,7
Pisang	51,5	Cabai	26,8
Nanas	47,2	Kentang	23,1
Jeruk lemon	45,0	Labu kuning	18,8
Jeruk bali	43,5	Tomat	13,7
Jeruk	31,0	Adas	13,0
Jeruk nipis	30,6	Bunga kol	12,5
Kiwi	28,1	Wortel	10,1
Semangka	11,6	Minuman	
Melon	7,8	Red wine (125 mL)	97
Sayur		Kopi (200 mL)	150
Brokoli	98,9	Teh (200 mL)	138

Sumber: telah diolah kembali dari Brat dkk²⁶

2.2.4. Asupan dan toksisitas polifenol

Rata-rata asupan polifenol secara tepat masih sulit ditentukan, hal ini antara lain disebabkan oleh karena struktur polifenol yang bermacam-macam dan kurangnya metoda analisis standar untuk mengetahui kandungan polifenol dalam bahan makanan sumber. Asupan polifenol bervariasi bergantung pada kebiasaan atau pola diet di wilayah tertentu, biasanya satu per tiga asupan berasal dari klas asam fenolik dan dua per tiga dari flavonoid.²⁸

Meskipun telah banyak penelitian tentang polifenol dalam usaha mencegah dan menghambat progresivitas penyakit, namun sedikit penelitian untuk melihat kemungkinan efek toksik yang dapat ditimbulkan oleh polifenol. Konsumsi polifenol dapat menyebabkan efek anti nutrisi, misalnya konsumsi teh yang tinggi dapat meningkatkan risiko defisiensi besi pada individu dengan status besi marginal, karena katekin dalam teh dapat menghambat absorpsi besi. Selain itu, penelitian pada hewan coba menunjukkan bahwa dengan pemberian proantosianidin dosis tinggi (10 g/kg berat badan) dapat berpengaruh negatif terhadap pertumbuhan karena dapat berinteraksi dengan protein dan menghambat beberapa enzim, namun efek ini tidak terjadi pada pemberian dosis lebih rendah.³⁴

Efek toksik juga dapat terjadi karena efek pro oksidan. Dalam suatu uji *in vitro*, pemberian polifenol dosis tinggi justru menyebabkan stres oksidatif yang dapat merusak dan mematikan sel. Hal ini karena sifat polifenol yang tidak stabil dan mudah teroksidasi, menghasilkan radikal bebas. Efek pro oksidan ini juga diduga karena pengaruh polimorfisme genetik pada jalur biotransformasi polifenol, seperti rendahnya enzim COMT, yang menyebabkan polifenol berikatan dengan quinon yang dapat meningkatkan radikal bebas dan menurunkan antioksidan glutation (GSH) di dalam sel.³⁵

Efek toksik sering terjadi pada organ usus, hati, dan ginjal disebabkan karena bioavailabilitas dan metabolisme polifenol terbanyak adalah pada organ-organ tersebut.³⁵

2.2.5. Kandungan polifenol dalam anggur

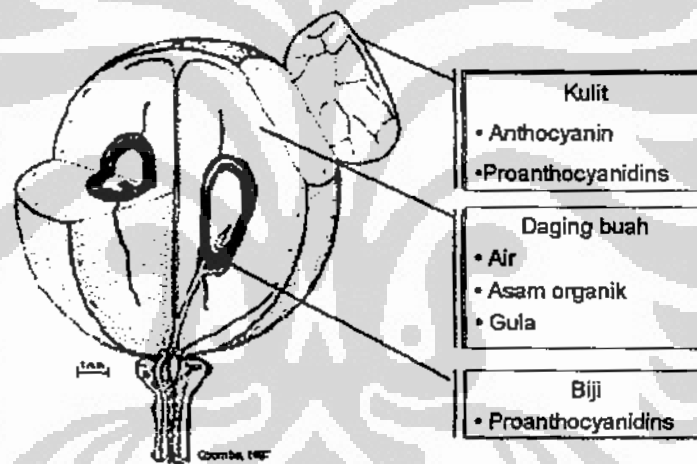
Polifenol yang terkandung dalam anggur terutama adalah stilben (resveratrol), antosianin, flavonol (quercetin) dan flavanol (proantosianidin).²⁵

Kandungan polifenol dalam anggur menentukan kualitas buah anggur dan hasil olahannya, dan bervariasi antar berbagai jenis anggur. Misalnya, kandungan polifenol dalam anggur merah lebih tinggi bila dibandingkan anggur hijau, bahkan kandungan polifenol anggur merah didapatkan bervariasi antara 36,1 mg/ 100 gram sampai 275,5 mg/ 100 gram buah anggur.¹⁰ Variasi kandungan polifenol tersebut

dapat dipengaruhi oleh varietas bibit, kondisi lingkungan dan pertumbuhan seperti kondisi tanah, suhu, cahaya, dan proses pengolahan.^{25,36}

Saat buah anggur mulai matang ukuran buah akan membesar, kandungan gula dan pH akan meningkat, sedangkan keasaman buah akan menurun. Saat ini pula, klorofil pada kulit buah akan menurun dan mulai mensintesis polifenol yang memberi warna buah, misalnya kandungan tinggi flavonol akan memberi warna kekuningan dan antosianin memberi warna merah sampai ungu.³⁶

Kandungan polifenol buah anggur terutama terdapat pada kulit dan bijinya (gambar 4), yaitu antosianin (26-37%), flavanol yaitu proantosianidin yang merupakan bentuk oligomer dari katekin (16-37%) dan epikatekin (12-26%), resveratrol (18-55%), serta quercetin (21%-52%). Kandungan flavanol dalam kulit anggur sekitar 11% sedangkan dalam bijinya sekitar 89%.^{25,27}



Gambar 2.4. Buah anggur dan komposisi dalam kulit, daging, dan biji buah (kelompok antosianin dan proantosianidin).

Sumber: telah diolah kembali dari Kennedy dkk²⁵

2.2.6. Peran polifenol dalam anggur terhadap penyakit kardiovaskuler

Beberapa penelitian mendapatkan bahwa kandungan polifenol dalam anggur dan produk olahannya dapat mencegah aterosclerosis sehingga dapat berperan mencegah dan menurunkan faktor risiko terjadinya PKV.^{14,37}

Peran polifenol pada buah anggur dalam mencegah PKV antara lain karena aktivitasnya sebagai antioksidan, yaitu sifatnya sebagai *scavenger* radikal bebas, dan *chelator* ion tembaga dan besi bebas yang membantu pembentukan radikal bebas.³⁸

Dalam mempertahankan homeostasis pembuluh darah, anggur juga mempunyai peran sebagai anti inflamasi karena dapat menghambat ekspresi faktor transkripsi gen pro inflamasi seperti *Nuclear Factor Kappa B* (NFκB), anti agregasi dan hipolipidemik.^{14,39}

2.3. Hiperkolesterolemia

Definisi hiperkolesterolemia adalah peningkatan kadar kolesterol total atau kadar kolesterol LDL,^{10,40} dan dipengaruhi oleh beberapa faktor risiko seperti faktor genetik, usia, jenis kelamin, obesitas, dan gaya hidup.^{10,40}

Pengukuran kadar kolesterol total darah merupakan pengukuran kadar kolesterol yang dibawa oleh semua fraksi lipoprotein, yaitu protein pembawa lemak darah, yang terdiri dari 60 - 70% kolesterol dibawa oleh *Low-Density Lipoprotein* (LDL), 20 - 30% dibawa oleh *High-Density Lipoprotein* (HDL), dan 10 - 15% dibawa oleh *Very Low-Density Lipoprotein* (VLDL).⁴¹

Klasifikasi kadar kolesterol total berdasarkan *National Cholesterol Education Program* (NCEP) *Adult Treatment Panel* (ATP) III 2002 dibedakan menjadi tiga kategori, yaitu kadar kolesterol total yang diharapkan (< 200 mg/dL), batas tinggi (200 - 239 mg/dL), dan tinggi (\geq 240 mg/dL).¹⁰

Studi prospektif oleh Klag dkk⁵ pada subyek berusia 25-47 tahun mendapatkan angka kejadian PKV pada subyek dengan kadar kolesterol total <190 mg/dL sebesar 18,5%, menjadi 22,4% pada subyek dengan kadar kolesterol 190-208 mg/dL, dan makin meningkat menjadi 37,7% pada subyek dengan kadar kolesterol >209 mg/dL, sehingga disimpulkan bahwa peningkatan kadar kolesterol total dapat

digunakan untuk memprediksi terjadinya PKV dalam 25 tahun kemudian. Hal ini disebabkan karena peningkatan kadar kolesterol dapat menyebabkan disfungsi endotel pembuluh darah yang merupakan penanda awal aterosklerosis, selanjutnya dapat menyebabkan PKV.^{3,8,9}

Peningkatan kadar kolesterol total merupakan salah satu faktor risiko terjadinya PKV, namun faktor ini dapat dimodifikasi. Penurunan kadar kolesterol total sebesar 1% akan menurunkan risiko terjadinya PKV sekitar 2%.¹⁰ Penelitian Caroll dkk⁴² mendapatkan bahwa penurunan kadar kolesterol total menggambarkan penurunan kadar kolesterol LDL.

2.4. Disfungsi endotel pembuluh darah

Disfungsi endotel adalah suatu keadaan yang ditandai dengan penurunan bioavailabilitas dan bioaktivitas NO, yang menyebabkan hilangnya homeostasis dinding pembuluh darah.⁴³

2.4.1. Endotel pembuluh darah dalam kondisi normal

Sel-sel endotel pembuluh darah mempunyai peran penting dalam meregulasi tonus pembuluh darah, serta menghambat inflamasi, aktivasi trombosit, dan trombosis. Senyawa yang paling berperan dalam dalam hal ini adalah *nitric oxide* (NO).⁴⁴

2.4.2. *Nitric oxide* (NO).

Nitric Oxide adalah senyawa berbentuk gas, bersifat sangat lipofilik, dan mempunyai waktu paruh sangat pendek yaitu sekitar tiga sampai enam detik.⁴⁴

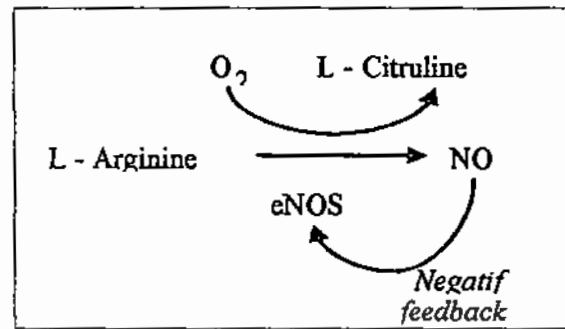
Seperti tampak pada gambar 2.5, NO disintesis dari L-arginin dan dikatalisis oleh enzim *nitric oxide synthase* (NOS). Apabila NO yang dihasilkan sudah cukup, maka NO dapat menghambat enzim eNOS melalui interaksi dengan molekul heme yang terdapat pada enzim eNOS.^{43,45}

Enzim NOS terdiri dari tiga tipe, yaitu tipe endotelial (eNOS), tipe neuronal (nNOS), dan tipe makrofag/ *inducible* (iNOS). Enzim eNOS terdapat dalam sel endotel pembuluh darah, platelet, serta endokardium dan miokardium jantung,

sedangkan enzim nNOS ditemukan di sel-sel saraf pusat dan perifer. Kedua enzim ini secara fisiologis terdapat dalam tubuh, namun tidak demikian halnya dengan enzim iNOS yang diekspresikan bila ada rangsangan dari eksotoksin atau endotoksin bakteri maupun mediator-mediator pro-inflamasi. Enzim iNOS diekspresikan oleh beberapa tipe sel, seperti sel makrofag dan sel hati.⁴⁵ Peningkatan produksi NO oleh enzim iNOS terbukti pada uji *in vitro* pada sel makrofag hewan coba, namun tidak demikian halnya dengan sel makrofag manusia yang lebih sulit untuk terjadi induksi enzim iNOS.⁴⁶

Ketiga tipe enzim NOS tersebut dalam melaksanakan fungsinya membutuhkan kofaktor seperti *tetrahydrobiopterin* (H₄B), *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH), *flavin-adenin dinucleotide* (FAD), dan *flavin-monomucleotide* (FMN). Diantara ketiga tipe enzim penghasil NO tersebut, enzim eNOS memegang peran penting dalam mempertahankan homeostasis endotel pembuluh darah dengan menjaga bioavailabilitas NO di dalam sel endotel.⁶

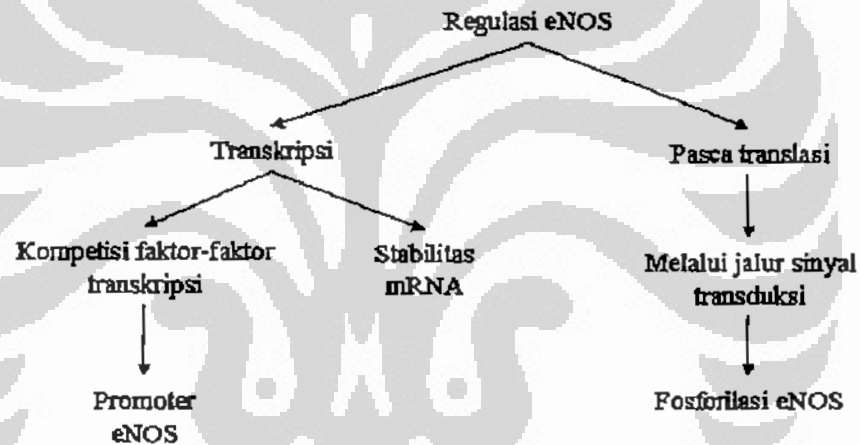
Enzim eNOS diregulasi pada saat transkripsi dan pasca translasi. Saat transkripsi, regulasi enzim eNOS dipengaruhi oleh kompetisi faktor-faktor transkripsi untuk berikatan dengan promotor eNOS, karena promotor eNOS mempunyai tempat berikatan dengan berbagai faktor transkripsi termasuk NF κ B (faktor transkripsi dari gen pro-inflamasi seperti kemokin, molekul adhesi, dan faktor protrombotik). Selain itu, regulasi enzim eNOS juga dipengaruhi oleh stabilitas *messenger ribonucleic acid* (mRNA) eNOS yang terbentuk. Sedangkan regulasi enzim eNOS pasca translasi salah satunya dipengaruhi oleh fosforilasi enzim eNOS pada Serin¹¹⁷⁷. Fosforilasi enzim eNOS pada Serin¹¹⁷⁷ ini distimulasi antara lain oleh rangsangan aliran darah dan insulin, melalui aktivasi jalur sinyal transduksi yaitu jalur fosfatidilinositol 3-kinase (PI 3-kinase) dan Akt.⁴⁷ Regulasi enzim eNOS dapat dilihat pada gambar 2.6.



Sel endotel

Gambar 2.5. Sintesis NO dalam sel endotel.

Sumber: telah diolah kembali dari Vallance⁴⁵



Gambar 2.6. Regulasi eNOS di dalam sel.

Sumber: telah diolah kembali dari Fleming dkk⁴⁷

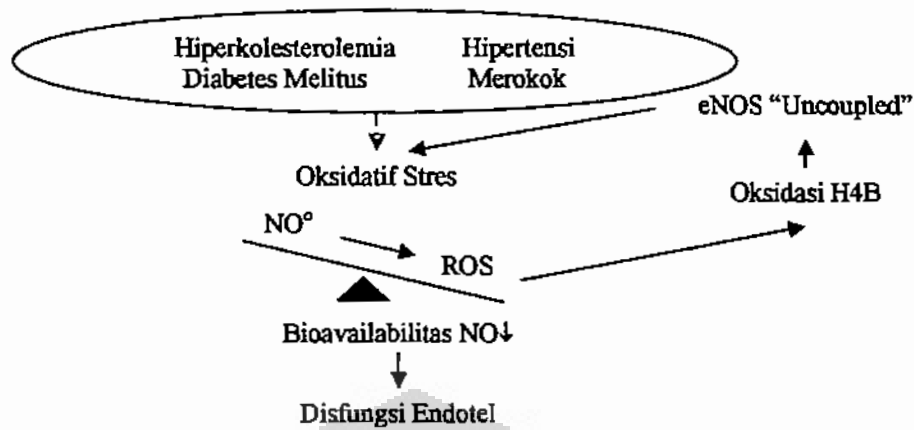
Peran NO dalam mempertahankan fungsi endotel pembuluh darah adalah mempertahankan keseimbangan vasodilatasi dan vasokonstriksi, serta mencegah terbentuknya trombus pada dinding pembuluh darah dengan menghambat agregasi platelet, mengurangi adhesi leukosit pada dinding pembuluh darah, mencegah proliferasi sel otot polos berlebihan dan mencegah inflamasi dengan cara menginaktivasi NFκB.^{6,45}

2.4.3. Hiperkolesterolemia dan patofisiologi disfungsi endotel pembuluh darah.

Hiperkolesterolemia maupun faktor risiko PKV lain seperti hipertensi, hiperglikemia, proses inflamasi kronis, kebiasaan merokok dan rendahnya aktivitas fisik dapat meningkatkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) di dalam sel endotel dan dapat menginaktivasi eNOS, yang menyebabkan penurunan bioaktivitas dan bioavailabilitas NO, serta kemudian menyebabkan terjadinya disfungsi endotel.^{44,48,49}

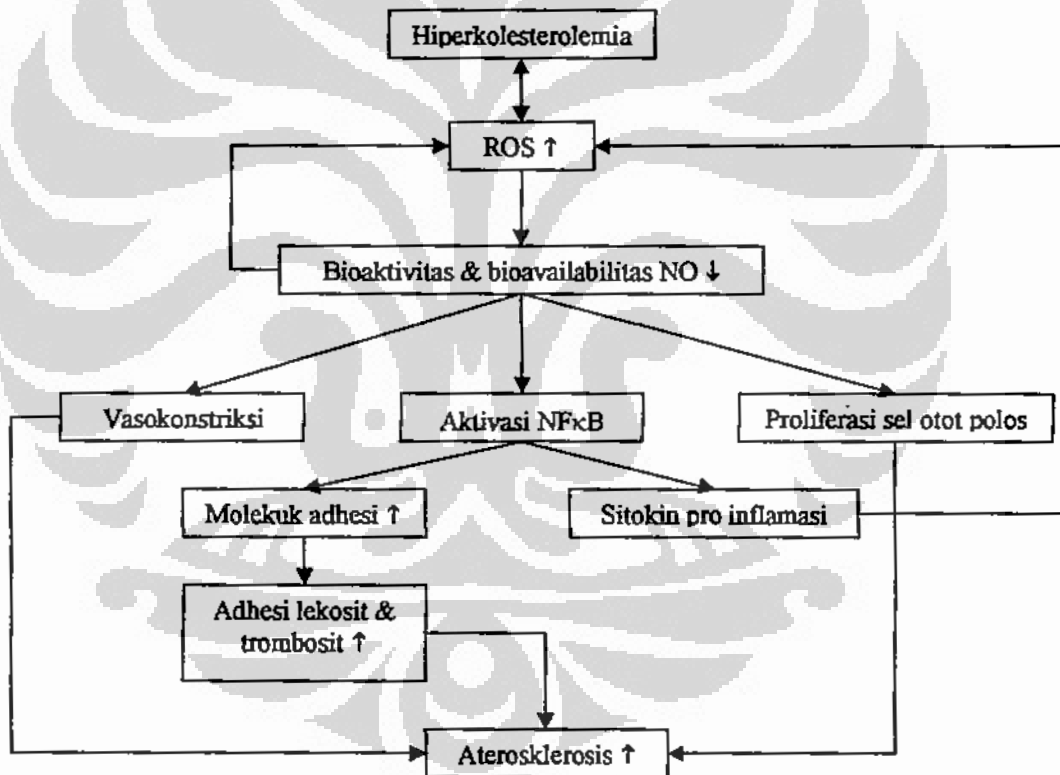
Senyawa ROS menginaktivasi eNOS antara lain melalui dua cara yaitu pertama, ROS (terutama superoksida) yang meningkat akan bereaksi dengan NO menyebabkan penurunan bioaktivitas NO dan terbentuk radikal peroksinitrit. Kedua, peningkatan ROS juga dapat menyebabkan kerusakan oksidatif H₄B sehingga terjadi penurunan produksi dan bioavailabilitas NO (gambar 2.7). Penurunan bioavailabilitas NO ini juga akan menurunkan kadar antioksidan di dinding arteri (terutama *superoxide dismutase*/SOD) karena NO berperan menginduksi SOD di dinding arteri.^{44,50}

Bioaktivitas dan bioavailabilitas NO yang menurun akan menyebabkan keseimbangan vasodilatasi dan vasokonstriksi sistim kardiovaskuler terganggu, meningkatkan proliferasi sel otot polos, serta terjadi aktivasi faktor transkripsi NFκB. Aktivasi NFκB ini akan menghasilkan sitokin pro-inflamasi, menyebabkan adhesi leukosit dan trombosit pada dinding pembuluh darah serta memicu terbentuknya trombus, yang menyebabkan aterogenesis dan aterosklerosis. Mekanisme terjadinya disfungsi endotel tersebut digambarkan pada gambar 2.8.^{6,43,47}



Gambar 2.7. Bioavailabilitas NO dan disfungsi endotel

Sumber: telah diolah kembali dari Cai dkk.⁵⁰



Gambar 2.8. Mekanisme terjadinya disfungsi endotel dan aterosklerosis.

Sumber: telah diolah kembali dari Fleming dkk.⁴⁷

Penelitian Lefer dkk⁹ pada hewan coba dengan memberikan diet tinggi kolesterol menyebabkan peningkatan kadar kolesterol darah dan penurunan kadar NO darah secara bermakna pada kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol, dan peningkatan respon vasokonstriksi dan adhesi lekosit pada sel endotel pada kelompok perlakuan. Namun setelah pemberian obat untuk menurunkan kadar kolesterol darah, didapatkan penurunan kadar kolesterol dan peningkatan kadar NO secara bermakna. Hasil yang sama didapatkan pula pada penelitian yang dilakukan oleh Desideri dkk⁸ pada subyek hiperkolesterolemia. Saat sebelum perlakuan, didapatkan kadar NO serum yang lebih rendah pada subyek hiperkolesterolemia dan berbeda bermakna bila dibandingkan subyek sehat. Setelah pemberian antioksidan α -tosterol, didapatkan penurunan bermakna kadar kolesterol total dan peningkatan bermakna kadar NO serum pada subyek hiperkolesterolemia.

2.4.4. Penatalaksanaan dalam mencegah dan memperbaiki fungsi endotel pembuluh darah

Berdasarkan Profil Kesehatan Indonesia 2006, PKV menjadi penyebab utama kematian di Indonesia,² dan hiperkolesterolemia merupakan salah satu faktor risikonya.⁴⁴

Disfungsi endotel yang dapat diakibatkan oleh hiperkolesterolemia bersifat reversibel, sehingga dengan memperbaiki kondisi tersebut maka risiko terjadinya PKV dapat diturunkan.^{8,9,44}

Pedoman NCEP-ATP III 2002 merekomendasikan modifikasi gaya hidup yang disebut TLC untuk menurunkan kadar kolesterol dan memperbaiki fungsi endotel yaitu meliputi mempertahankan berat badan normal, melakukan olahraga teratur, tidak merokok, membatasi konsumsi energi, lemak dan kolesterol, serta meningkatkan konsumsi buah dan sayur sebagai sumber serat dan antioksidan.¹⁰

Penelitian Jungersten dkk⁵¹ mendapatkan bahwa olahraga yang teratur dapat meningkatkan kadar NO secara bermakna dan memperbaiki fungsi endotel pembuluh darah. Hasil yang sama juga didapatkan oleh Croce dkk¹² yang memberikan konseling tentang diet dan olahraga pada subyek penelitian.

Peningkatan radikal bebas dan stres oksidatif merupakan penyebab terjadinya disfungsi endotel. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa dengan pemberian antioksidan seperti vitamin C¹³ dan vitamin E⁸ juga dapat memperbaiki fungsi endotel pembuluh darah.

2.5. Pengaruh anggur terhadap fungsi endotel pembuluh darah

Anggur merupakan salah satu buah dengan kandungan polifenol tinggi, sedangkan polifenol diketahui mempunyai efek kardioprotektif. Sehingga beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian anggur maupun produk olahannya terhadap kadar kolesterol dan fungsi endotel pembuluh darah.

Penelitian eksperimental oleh Castilla dkk¹⁸ yang memberikan 100 ml jus anggur per hari selama 14 hari pada 26 penderita gagal ginjal dengan hemodialisis dibandingkan dengan 12 penderita dengan hemodialisis yang tidak mendapatkan jus anggur dan 15 subyek sehat yang mendapatkan jus anggur. Setelah perlakuan didapatkan penurunan bermakna penanda inflamasi, yang menandakan perbaikan fungsi endotel pembuluh darah, serta penurunan bermakna kadar kolesterol total pada kelompok subyek yang mendapatkan jus anggur, dan berbeda bermakna bila dibandingkan dengan kelompok yang tidak mendapatkan jus anggur.

Matsuo dkk¹⁹ mendapatkan peningkatan kadar NO secara bermakna 30 menit setelah pemberian *red wine* pada subyek sehat, dan menyimpulkan bahwa kandungan polifenol dalam *red wine* berperan dalam meningkatkan kadar NO dan memperbaiki fungsi endotel.

Freedman dkk²⁰ melakukan penelitian eksperimental dengan rancangan *pre-post test*, pada 20 subyek sehat laki-laki dan perempuan, berusia 20 – 45 tahun dengan memberikan produk jus anggur ungu sebanyak 7 mL/ kg BB/ hari. Hasil penelitian menunjukkan terjadi peningkatan kadar NO, dan kapasitas antioksidan total, serta penurunan kadar superoksida dan agregasi trombosit secara bermakna pada subyek setelah konsumsi jus anggur selama 14 hari.

Mekanisme pasti jus anggur dalam meningkatkan kadar NO belum diketahui, namun Freedman dkk berpendapat bahwa hal ini karena fungsi polifenol dalam jus

anggur ungu sebagai antioksidan sehingga membantu mengatasi timbulnya radikal bebas. Hal tersebut dibuktikan dengan peningkatan kapasitas antioksidan total dan penurunan radikal superoksida secara bermakna. Penurunan radikal superoksida berperan dalam mencegah terbentuknya reaksi radikal peroksinitrit dan memperbaiki bioaktivitas dan bioavailabilitas dari NO, sehingga mencegah terjadinya agregasi trombosit.²⁰

Freedman dkk²⁰ juga melakukan uji *in vitro* pada sel, untuk mengetahui kandungan polifenol jus anggur yang dominan dalam memberikan efek tersebut. Dari beberapa kandungan polifenol anggur yang diisolasi, ternyata proantosianidin dan antosianin yang mempunyai peran besar dalam meningkatkan kadar NO.

Stein dkk²¹ memberikan produk jus anggur ungu yang sama dengan Freedman dkk sebanyak 8 mL/ kgBB/ hari selama 14 hari pada 15 subyek, rata-rata berusia 60 tahun, dan mempunyai faktor risiko PKV seperti dislipidemia dan hipertensi. Hasil penelitian menunjukkan terjadinya peningkatan FMD arteri brakialis secara bermakna pada subyek penelitian setelah pemberian jus anggur, sehingga disimpulkan bahwa peningkatan FMD arteri brakialis tersebut karena kemampuan kandungan polifenol dalam jus anggur dalam memperbaiki bioavailabilitas NO seperti dibuktikan oleh Freedman dkk.

Sedangkan penelitian eksperimental Albers dkk²² memberikan perlakuan yang sama dengan Freedman dkk pada 40 subyek dengan faktor risiko PKV, yang dibagi menjadi kelompok perlakuan (20 subyek) dan kelompok kontrol (20 subyek), menunjukkan bahwa pemberian jus anggur tidak berhasil meningkatkan kadar NO secara bermakna.

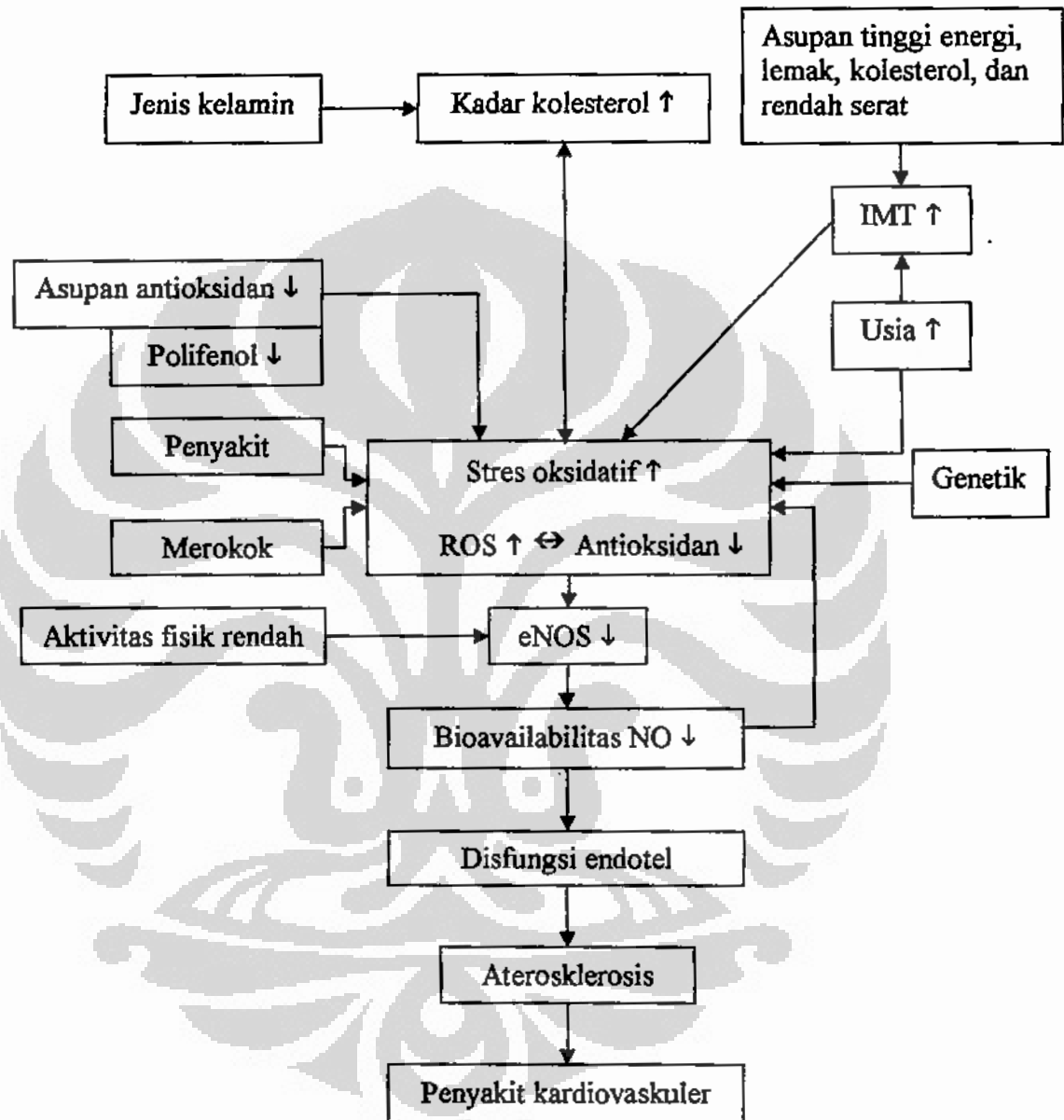
Leikert dkk¹⁶ melakukan uji *in vitro* pada kultur *human umbilical vein endothelial cells* (HUVECs) untuk mengetahui mekanisme polifenol anggur dalam mencegah dan menurunkan kejadian PKV. Pada penelitian ini dilakukan pemberian ekstrak polifenol dari *red wine* 100 sampai 600 µg/mL pada kultur HUVECs. Hasilnya menunjukkan peningkatan bermakna produksi NO dengan pemberian polifenol *red wine* terjadi pada dosis 400 sampai 600 µg/mL. Setelah pemberian polifenol *red wine* dosis 600 µg/mL, pada kultur sel ditambahkan NG-amino-L-

arginin (yaitu suatu senyawa inhibitor NOS) dan menyebabkan hilangnya penurunan produksi NO secara bermakna. Pada kultur sel yang lain dilakukan pengukuran kadar enzim eNOS dengan pemberian polifenol, dan didapatkan peningkatan bermakna kadar enzim eNOS pada dosis 400 dan 600 $\mu\text{g/mL}$. Selain itu, didapatkan peningkatan bermakna aktivitas promotor gen enzim eNOS. Dari hasil penelitian tersebut, Leikert dkk menyimpulkan bahwa kandungan polifenol dalam anggur dapat meningkatkan produksi NO karena dapat meningkatkan aktivitas enzim eNOS dengan mempengaruhi tahap transkripsi yaitu meningkatkan aktivitas promotor gen enzim eNOS.

Leikert dkk¹⁶ juga mengisolasi kandungan beberapa polifenol dalam *red wine* (resveratrol, antosianin, dan quercetin) untuk mengetahui polifenol yang dominan dalam meningkatkan aktivitas gen promotor eNOS dan produksi NO, dan diduga ada efek sinergis antar kandungan polifenol dalam *red wine*.

Penelitian secara *in vitro* juga dilakukan oleh Anselm dkk¹⁷ pada kultur pembuluh darah arteri hewan coba untuk mengetahui mekanisme polifenol dalam jus anggur ungu terhadap pembuluh darah. Pada kultur sel diberikan jus anggur ungu 44 mg/L dan didapatkan peningkatan bermakna produksi NO oleh sel. Setelah itu ditambahkan N^o-nitro-arginin (L-NA) yaitu inhibitor NOS 300 μM , *Worthmannin* yaitu inhibitor PI-3 kinase 30 nM, serta PP2 (protein fosfatase 2) yaitu inhibitor Src kinase sebanyak 10 μM . Hasilnya didapatkan penurunan bermakna produksi NO oleh sel. Kemudian pada kultur sel yang lain diberikan jus anggur dengan dosis 44 mg/L dan dilakukan pemeriksaan kadar eNOS, Akt, dan Src (*steroid receptor coactivator*) untuk mengetahui mekanisme jus anggur dalam mempengaruhi jalur protein kinase dan meningkatkan produksi NO oleh sel. Hasil penelitian menunjukkan bahwa jus anggur menyebabkan peningkatan kadar Src, Akt, dan enzim eNOS. Anselm dkk¹⁷ menyimpulkan bahwa jus anggur dapat meningkatkan produksi NO melalui jalur fosforilasi protein kinase dengan meningkatkan fosforilasi protein Src yang menyebabkan fosforilasi PI3-kinase/Akt, dan kemudian memfosforilasi enzim eNOS sehingga meningkatkan produksi NO oleh sel endotel.

2.6. Kerangka teori

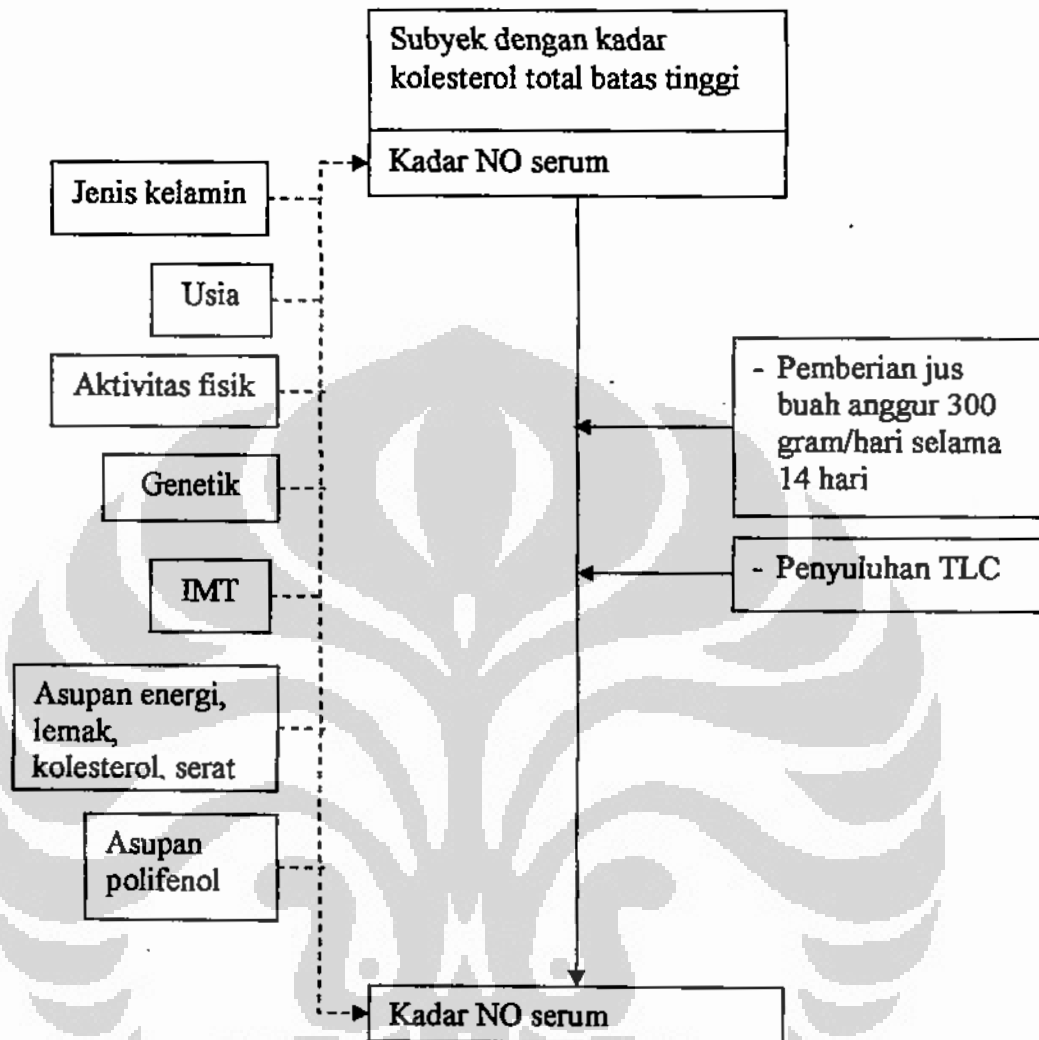


Keterangan :

↑ : meningkat

↓ : menurun

2.7. Kerangka konsep



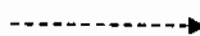
Keterangan :



: diteliti



: dicari hubungannya



: tidak dicari hubungannya

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan suatu *field trial*, membandingkan kelompok yang mendapat jus anggur disertai penyuluhan TLC (P) dengan kelompok yang hanya mendapat penyuluhan TLC (K).

3.2. Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan pada warga asrama Polri Cipinang, Jakarta. Pengumpulan data dilakukan bulan Mei sampai Juni 2009. Penelitian berlangsung dari bulan April sampai dengan November 2009.

3.3. Bahan penelitian

3.3.1. Populasi target

Populasi target adalah semua laki-laki dan perempuan, berusia 25 – 44 tahun, dengan kadar kolesterol total batas tinggi (200-239 mg/dL).

3.3.2. Populasi terjangkau

Populasi terjangkau adalah semua anggota Polri dan PNS baik laki-laki dan perempuan beserta pasangannya, berusia 25-44 tahun, yang tinggal di asrama Polri Cipinang dengan kadar kolesterol total batas tinggi pada bulan Juni 2009.

3.3.3. Subyek penelitian

Subyek penelitian adalah bagian dari populasi terjangkau yang memenuhi kriteria penelitian, dan secara tertulis menyatakan bersedia ikut serta dalam penelitian dengan menanda tangani formulir persetujuan. Alokasi subyek dilakukan dengan cara randomisasi sederhana.

Kriteria penerimaan:

- Laki-laki atau perempuan usia 25-44 tahun.
- IMT :18,5-29,9 kg/m²
- Tidak merokok.
- Tekanan darah < 140/90 mmHg.
- Tidak mengonsumsi obat yang dapat mempengaruhi metabolisme lemak (seperti fibrat, statin, steroid, dan antihipertensi), juga penggunaan bahan seperti obat (seperti jamu, suplemen)
- Tidak mengonsumsi suplemen antioksidan atau vitamin.
- Perempuan yang tidak sedang hamil, yang diketahui melalui anamnesis.
- Secara tertulis bersedia mengikuti penelitian dengan menandatangani formulir persetujuan.

Kriteria penolakan:

- Kadar kolesterol total < 200 mg/dL atau \geq 240 mg/dL.
- Menderita penyakit diabetes melitus dengan kadar gula darah puasa \geq 126 mg/dL, kelainan fungsi hati dengan hasil pemeriksaan SGOT \geq 27 U/L atau SGPT \geq 34 U/L, kelainan fungsi ginjal dengan hasil pemeriksaan ureum >43 mg/dL atau kreatinin >0,9 mg/dL.

Kriteria pengeluaran:

- Subyek penelitian tidak mengonsumsi jus anggur dalam jumlah yang telah ditetapkan selama dua hari berturut-turut.
- Subyek penelitian menolak melanjutkan penelitian.
- Selama periode penelitian subyek sakit berat.

3.3.4. Besar sampel

Besar sampel yang diperlukan untuk masing-masing kelompok dihitung berdasarkan rumus:⁵²

$$n_1 = n_2 = 2 \left[\frac{(Z_\alpha + Z_\beta) s}{x_1 - x_2} \right]^2$$

$n_1 = n_2$: besar sampel minimal untuk masing-masing kelompok.

Z_α : deviasi relatif yang menggambarkan derajat kepercayaan dalam pengambilan kesimpulan statistik sebesar 1,96 untuk $\alpha = 0,05$

Z_β : deviasi relatif yang menggambarkan tingkat kekuatan uji statistik dalam menetapkan batas kemaknaan, ditetapkan 0,842 untuk $\beta = 0,20$

s : simpang baku kedua kelompok

$x_1 - x_2$: perbedaan dua rerata (dapat ditetapkan oleh peneliti)

Besar sampel berdasarkan kadar NO serum:

s : simpang baku kadar NO serum yaitu 19,40 $\mu\text{mol/L}$.¹⁹

$x_1 - x_2$: perbedaan rerata kadar NO serum yaitu 19,00 $\mu\text{mol/L}$.

Maka besar sampel :

$$n_1 = n_2 = 2 \left[\frac{(Z_\alpha + Z_\beta) s}{x_1 - x_2} \right]^2$$

$$n_1 = n_2 = 16$$

Jumlah sampel yang diperlukan untuk perubahan kadar NO serum adalah 16 orang, perkiraan *drop out* 10% (1,6 orang atau 2 orang). Maka besar sampel yang diperlukan masing-masing kelompok adalah 18 orang.

3.4. Asupan makanan yang diberikan

Kelompok perlakuan (P) dan kontrol (K)

Kedua kelompok mendapatkan penyuluhan TLC pada H-7, H1, dan H8, sesuai dengan pedoman dalam NCEP-ATP III tahun 2001.¹⁰

Kelompok P

Kelompok P mendapatkan asupan jus anggur *Red Globe* dari 300 gram buah anggur (kandungan polifenol \pm 588 mg)²⁶ sebanyak satu kali per hari dari H1 sampai H14. Kandungan polifenol dalam jus anggur yang diberikan selama masa perlakuan lebih tinggi dibandingkan dengan penelitian Freedman dkk²⁰ (7 mL/kg BB/hari), namun lebih rendah dibandingkan Stein dkk²¹ (8 mL/kg BB/hari). Kedua penelitian tersebut menggunakan jus anggur dengan kandungan polifenol sekitar 1,2 mg/mL jus. Rerata berat badan untuk subyek penelitian diperkirakan 65 kg. Lamanya pemberian jus anggur pada penelitian ini sama dengan kedua penelitian tersebut yaitu 14 hari.

3.5. Instrumen pengumpulan data

3.5.1. Lampiran dan formulir

Lampiran 1 : lembar persetujuan komisi etik

Lampiran 2

Formulir A1 : lembar informasi penelitian untuk kelompok kontrol

Formulir A2 : lembar informasi penelitian untuk kelompok perlakuan

Formulir A3 : lembar persetujuan subyek

Formulir A4 : lembar seleksi subyek

Formulir A5 : lembar data karakteristik subyek

Lampiran 3

Formulir B1 : lembar catatan asupan makanan (*food record*)

Formulir B2 : lembar keluhan dan kepatuhan subyek

Lampiran 4

Formulir C1 : lembar data antropometri berat badan (BB), tinggi badan (TB), indeks massa tubuh (IMT)

Formulir C2 : lembar data laboratorium.

Lampiran 5 : prosedur randomisasi sederhana

Lampiran 6 : lembar contoh menu yang sesuai dengan komposisi seimbang

Lampiran 7 : pembatasan pada masa *run-in* dan perlakuan

Lampiran 8 : lembar indeks aktivitas fisik.

Lampiran 9 : prosedur pemeriksaan kadar kolesterol total serum.

Lampiran 10 : prosedur pemeriksaan kadar NO serum.

Lampiran 11 : lembar prosedur pembuatan jus anggur.

3.5.2. Spesimen

- Darah vena kubiti sebanyak 5 mL untuk pemeriksaan kolesterol total, kadar gula darah, ureum, kreatinin, SGOT, dan SGPT pada saat seleksi subyek.
- Darah vena kubiti sebanyak 1 mL untuk pemeriksaan kadar NO serum sebelum perlakuan, serta kadar kolesterol total dan NO serum sesudah perlakuan.

3.5.3. Peralatan

- *Dysposable syringe needle* 5 mL
- *Vacutainer* berisi EDTA
- Torniket
- Kapas alkohol 70%
- Sentrifugator
- Tabung sentrifugator
- Kotak pendingin
- Stetoskop merk Littmann
- Sphigmomanometer air raksa dengan manset merk Riester
- Timbangan BB merk *microprocessor Seca alpha* dengan ketelitian 0,1 kg
- Alat ukur TB *microtoise stature 2 m* dengan ketelitian 0,1 cm

- Alat timbangan bahan makanan dengan ketelitian 50 gram.
- Blender Miyako
- *Food models*

3.6. Cara kerja

3.6.1. Cara memperoleh subyek penelitian

Setelah mendapat persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dan ijin penelitian dari Markas Besar Kepolisian Republik Indonesia dan Kepala asrama Polri Cipinang, dilakukan pemberian informasi penelitian kepada anggota Polri dan PNS beserta pasangannya yang tinggal di asrama Polri Cipinang. Pada saat yang telah ditentukan, calon subyek dikumpulkan untuk mendapatkan informasi penelitian yang meliputi tujuan penelitian, manfaat penelitian, kriteria subyek yang dapat ikut, serta intervensi dan pemeriksaan yang dilakukan. Selanjutnya dilakukan seleksi subyek sesuai dengan kriteria penelitian melalui wawancara, pemeriksaan antropometrik, tekanan darah dan laboratorium. Subyek yang didapatkan dari hasil seleksi kemudian dirandomisasi menggunakan tabel angka random, menjadi dua kelompok yaitu kelompok perlakuan (P) dan kontrol (K).

Randomisasi sederhana dilakukan dengan cara menentukan angka 0-4 untuk kelompok P dan 5-9 untuk kelompok K. Dengan mata tertutup, ditunjuk satu titik pada tabel angka random. Angka yang berada paling dekat dengan titik yang ditunjuk kemudian dibaca ke kanan, misalnya didapatkan urutan angka 512500843384085301 dan seterusnya, maka didapatkan urutan kelompok KPPKPPKPPP KPPKPPPP dan seterusnya.

Bagi yang bersedia ikut diminta untuk mengisi dan menandatangani lembar persetujuan dan dikembalikan pada peneliti sebagai bukti turut serta dalam penelitian.

3.6.2. Pelaksanaan penelitian

Pelaksanaan penelitian dibagi dalam tiga periode yaitu sebelum perlakuan, perlakuan, dan sesudah perlakuan.

A. Periode sebelum perlakuan (H-20 sampai H0)

Pada H-20 dilakukan pemberian informasi untuk pertama kali. Para calon subyek diundang datang untuk diberikan penjelasan tentang penelitian, termasuk periode *run-in* selama tujuh hari.

Pada H-15 sampai H-9, dilakukan seleksi subyek melalui wawancara, pemeriksaan tekanan darah, status gizi menurut antropometri, dan pemeriksaan laboratorium yaitu kadar kolesterol total, gula darah, ureum, kreatinin, SGOT, dan SGPT. Subyek telah diinstruksikan untuk berpuasa 10-12 jam sebelumnya.

Pada H-8 telah diketahui subyek yang memenuhi kriteria penelitian, dan dilakukan randomisasi sederhana untuk membagi subyek penelitian menjadi kelompok P dan K. Pada saat ini dilakukan juga wawancara untuk memperoleh data karakteristik subyek.

Pada H-7 dilakukan penyuluhan TLC yang pertama kali, kemudian kepada semua subyek diberikan contoh menu dengan komposisi seimbang (lampiran 6), daftar makanan yang perlu dibatasi selama masa *run-in* dan periode perlakuan (lampiran 7), serta lembar *food record* (formulir B1) untuk mencatat asupan makanan dan minuman selama masa *run-in* (H-7 sampai H-1). Pencatatan dalam lembar *food record* dilakukan oleh subyek sebanyak dua kali dalam seminggu, satu hari pada hari kerja dan satu hari pada hari libur.

Pada H-7 sampai H-1 semua subyek melakukan periode *run-in*, yaitu waktu untuk standarisasi makanan dan gaya hidup sesuai yang ditetapkan dalam penelitian.

Pada H0 dilakukan pemeriksaan antropometri dan pengambilan darah untuk pemeriksaan kadar NO serum, setelah malamnya berpuasa 10-12 jam.

Selain itu, data asupan makanan dan minuman pada periode *run-in* yang telah dicatat oleh subyek dalam lembar *food record* diserahkan kepada peneliti.

B. Periode perlakuan (H1-H14)

Periode perlakuan terdiri dari dua minggu yaitu minggu pertama pada H1 sampai H7, dan minggu ke dua pada H8 sampai H14.

Kelompok P dan K

Pada H1 dilakukan penyuluhan TLC dan diberikan lembar *food record* untuk mencatat asupan makanan dan minuman (dua kali seminggu) pada minggu pertama periode perlakuan .

Pada H8 dilakukan penyuluhan TLC, dan data asupan makanan dan minuman pada minggu pertama periode perlakuan yang telah dicatat dalam lembar *food record* diserahkan kepada peneliti. Kemudian kepada subyek diberikan lembar *food record* untuk mencatat asupan makanan (dua kali seminggu) pada minggu ke dua periode perlakuan.

Kelompok P

Mulai H1 sampai dengan H14 subyek penelitian mengonsumsi jus anggur dari buah anggur segar 300 gram satu kali per hari yang telah disediakan peneliti dan meminumnya di hadapan peneliti. Kepada subyek ditanyakan keluhan atau gangguan yang dirasakan selama mengonsumsi jus anggur, kemudian keluhan dicatat dalam lembar keluhan dan kepatuhan subyek, selanjutnya kepada subyek diberikan saran agar tidak terjadi gangguan kembali.

C. Periode sesudah perlakuan (H15)

Pada H15 dilakukan pengambilan darah untuk pemeriksaan kadar NO dan kolesterol total serum, setelah malamnya berpuasa selama 10-12 jam. Selain itu, data asupan makanan dan minuman pada minggu ke dua periode perlakuan yang telah dicatat dalam *food record* diserahkan kepada peneliti.

3.6.3. Prosedur pengumpulan data

Wawancara

Wawancara dilakukan dengan menggunakan kuesioner untuk mendapatkan data karakteristik subyek.

Pengukuran antropometri

Pengukuran berat badan dan tinggi badan dilakukan pada H0 dan H15. Pengukuran berat badan dan tinggi badan dilakukan dua kali dan diambil nilai rata-rata dari hasil pengukuran tersebut. Hasil yang didapat digunakan untuk menentukan Indeks Massa Tubuh (IMT).⁵³

1. Prosedur pengukuran tinggi badan

Menggunakan *microtoise stature 2 m* dengan ketelitian 0,1 cm yang digantungkan pada dinding setinggi dua meter dari lantai dengan satuan sentimeter tepat pada posisi nol. Pada waktu pengukuran, subyek tanpa alas kaki berdiri pada permukaan datar dan tumit rapat, kepala tegak menempel pada dinding sehingga pandangan tegak lurus dengan sumbu tubuh (*Frankfurt plane*). Bahu relaks, kedua lengan tergantung bebas di sisi tubuh, punggung, bokong, dan tumit menempel pada dinding. Kedua kaki lurus dan kedua lutut rapat. Papan *microtoise* diturunkan sampai menyentuh bagian paling atas kepala dan rambut tertekan. Pengukuran tinggi badan dilakukan saat subyek inspirasi maksimum.⁵³

2. Prosedur pengukuran berat badan

Menggunakan alat timbangan berat badan *microprocessor Seca alpha* dengan ketelitian 0,1 kg yang ditempatkan di tempat yang keras, permukaan yang rata dan jarum timbangan menunjukkan angka nol. Alat timbangan harus ditera lebih dahulu. Subyek berdiri di tengah permukaan timbangan dan melihat lurus ke depan, berdiri tegak tanpa dibantu, tenang, memakai baju seringan mungkin dan tanpa alas kaki atau kaus kaki.⁵³

Pengukuran tekanan darah

Pengukuran tekanan darah dilakukan oleh tenaga yang sudah dilatih sebelumnya. Alat-alat yang digunakan yaitu stetoskop Littmann dan sfigmomanometer air raksa Riester dengan manset yang diletakkan di atas permukaan datar. Kafein dan latihan fisik harus dihindari minimal 30 menit sebelum pemeriksaan. Subyek penelitian dalam posisi duduk tenang di kursi selama minimal lima menit, dengan kaki menapak pada lantai, dan lengan berada pada posisi setinggi jantung. Manset dipasang melingkar pada lengan sesuai dengan ukuran lengan subyek, dengan bagian bawah manset 2-3 cm di atas fossa kubiti dan bagian selang karet yang menekan tepat di atas arteri brakialis. Denyut arteri radialis diraba dengan jari telunjuk dan jari tengah serta pastikan pandangan pemeriksa harus sejajar dengan permukaan air raksa. Katup pengontrol manset ditutup kemudian manset dipompa sampai denyut arteri radialis tak teraba lagi. Stetoskop dipakai tepat ke dalam telinga pemeriksa, dan kepala stetoskop diletakkan di atas fossa kubiti. Manset kembali dipompa sampai diatas batas akhir terabanya denyut nadi, kemudian katup pengontrol dilepaskan secara pelan-pelan sehingga air raksa turun dengan kecepatan 2-3 mm Hg per detik. Pastikan tinggi air raksa saat terdengar detakan pertama (Korotkoff I), ini adalah tekanan darah sistolik. Pastikan tinggi air raksa saat terjadi perubahan suara yang tiba-tiba melemah (Korotkoff V), ini adalah tekanan darah diastolik. Manset dilepaskan dari lengan subyek dan pengukuran dapat diulang kembali dengan menunggu minimal 30 detik.⁵³

Pemeriksaan laboratorium

Pemeriksaan laboratorium pertama kali dilakukan untuk seleksi subyek pada H-20 sampai H-9 meliputi: kolesterol total (200-239 mg/dL), tes fungsi hati (SGOT < 27 U/L; SGPT < 34 U/L), fungsi ginjal (ureum 13-43 mg/dL; kreatinin 0,5-0,9 mg/dL), gula darah puasa (\leq 126 mg/dL). Pemeriksaan kadar kolesterol total serum juga dilakukan pada H15.

Pemeriksaan kadar NO serum dilakukan di laboratorium Prodia dengan metode *Griess* dan menggunakan kit dari *Cayman Chemical*. Setelah subyek berpuasa 10-12 jam, pagi hari dilakukan pengambilan darah vena kubiti sebanyak 1 mL. Selanjutnya darah didiamkan selama 30-60 menit, disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm, dan disimpan pada suhu -70° sampai pemeriksaan dilakukan.

Penilaian asupan makanan

Data asupan makanan diperoleh dengan metode *food record* 2 x 24 jam, yaitu subyek diminta untuk mencatat semua makanan dan minuman yang telah dikonsumsi, baik jenis dan jumlahnya, selama 24 jam dalam formulir catatan asupan makanan. Pencatatan dilakukan dua kali dalam seminggu yaitu satu hari kerja dan satu hari libur. Jumlah makanan dan minuman diukur menggunakan ukuran standar seperti sendok, gelas, dan lain-lain.

3.7. Identifikasi variabel

- Variabel bebas : Pemberian jus anggur 300 gram
- Variabel terikat : Kadar NO serum

3.8. Manajemen dan Analisis Data

Pengolahan data

Data yang diperoleh dari seluruh pemeriksaan (wawancara, pemeriksaan antropometri dan laboratorium) dikumpulkan, kemudian dilakukan pengolahan data yang meliputi *editing*, *coding*, *entry* dan *cleaning* data dengan menggunakan kalkulator dan komputer.

Analisis Data

Data dianalisis dengan menggunakan program *Statistical Program for Social Science* (SPSS) versi 11.5. Analisis data asupan zat gizi menggunakan program *Nutrisurvey* 2007, dan analisis asupan polifenol menggunakan daftar bahan

makanan sumber polifenol dan dihitung secara manual dengan menggunakan kalkulator.

Uji statistik yang digunakan :

- Untuk mengetahui data mempunyai sebaran normal atau tidak secara analitik maka digunakan uji Shapiro Wilk. Bila didapatkan nilai $p > 0,05$ maka data berdistribusi normal sehingga digunakan rerata dan simpang baku, sedangkan bila $p \leq 0,05$ maka data tidak berdistribusi normal sehingga digunakan nilai median dan nilai rentang persentil 25 dan persentil 75.
- Untuk menganalisis perbedaan hasil pada kedua kelompok, bila kedua data berdistribusi normal maka akan digunakan uji t tidak berpasangan, sedangkan bila salah satu atau kedua data berdistribusi tidak normal akan digunakan uji Mann-Whitney.
- Untuk menilai perbedaan hasil sebelum dan sesudah perlakuan dalam satu kelompok, bila kedua data berdistribusi normal maka akan digunakan uji t berpasangan, sedangkan bila salah satu atau kedua data berdistribusi tidak normal akan digunakan uji Wilcoxon.
- Batas kemaknaan yang digunakan adalah sebesar 5%, yaitu bermakna bila $p < 0,05$ dan tidak bermakna bila $p \geq 0,05$.

Penyajian Data

Data akan disajikan dalam bentuk tekstular, tabular, dan grafik, serta disajikan dalam bentuk tesis dan diuji di hadapan para penguji.

3.9. Batasan operasional

1. Subyek penelitian

Subyek penelitian adalah anggota Polri dan PNS baik laki-laki dan perempuan beserta pasangannya yang tinggal di asrama Polri Cipinang, dengan kadar kolesterol total 200-239 mg/dL dan memenuhi kriteria penelitian.

2. Usia

Usia adalah umur berdasarkan tanggal lahir yang tertera di Kartu Tanda Penduduk (KTP) dan ditentukan berdasarkan hari ulang tahun terakhir. Usia subyek dikelompokkan menjadi 25-34 tahun dan 35-44 tahun.

3. Aktivitas fisik

Aktivitas fisik adalah segala bentuk kegiatan subyek yang biasa dilakukan sehari-hari. Penilaian indeks aktivitas fisik dilakukan dengan wawancara menggunakan kuesioner indeks aktivitas fisik, dikelompokkan berdasarkan nilai intensitas (I), durasi (D), dan frekuensi (F).

Indeks aktivitas fisik dihitung berdasarkan persamaan:

$$\text{Indeks aktivitas fisik (IAF)} = I \times D \times F$$

Tabel 3.1. Interpretasi indeks aktivitas fisik

Nilai total	Indeks aktivitas fisik
1 - 20	E = rendah
21 - 40	D = cukup
41 - 60	C = rata-rata
61 - 80	B = baik
81 - 100	A = sangat baik

Sumber: telah diolah kembali dari Mantoye dkk³⁵

4. Status gizi

Status gizi ditentukan dengan perhitungan indeks massa tubuh (IMT). IMT adalah hasil pembagian berat badan (BB) dalam kilogram dengan tinggi badan (TB) kuadrat dalam meter (kg/m^2).

Tabel 3.2. Klasifikasi status gizi

Klasifikasi	IMT (kg/m^2)
Berat badan normal	18,5 - 22,9
Berat badan lebih	≥ 23
Berisiko	23 - 24,9
Obes I	25-29,9

Sumber : telah diolah kembali dari WHO-WRPO 2000.³⁴

5. Asupan energi dan zat gizi

Data asupan zat gizi diperoleh dengan menggunakan metode *food record 2x24* jam dalam seminggu, pada sebelum, minggu pertama dan ke dua perlakuan.

A. Asupan energi

Asupan energi per hari adalah besarnya jumlah kalori yang dikonsumsi tiap subyek per hari dibandingkan dengan kebutuhan energi total (KET) per individu. KET tersebut tergantung dari kebutuhan energi basal (KEB) dan aktivitas fisik (AF) masing-masing individu.

Untuk menentukan kebutuhan energi total (KET) maka :

$$\text{KET} = \text{KEB} + \text{AF}$$

Kebutuhan energi basal dihitung dengan menggunakan rumus Harris-Benedict:

$$\text{KEB laki-laki} = 66 + (13,7 \times \text{BB}) + (5 \times \text{TB}) - (6,8 \times \text{U})$$

$$\text{KEB perempuan} = 655 + (9,63 \times \text{BB}) + (1,8 \times \text{TB}) - (4,73 \times \text{U})$$

Keterangan: BB = berat badan (kg), TB = tinggi badan (cm), U = usia (tahun)

Aktivitas fisik dihitung berdasarkan Indeks Aktivitas Fisik (IAF) dan dibagi menjadi rendah, sedang, dan tinggi. Kemudian ditentukan penambahan kalorinya yaitu:

Rendah : ditambah 10% dari kebutuhan basal

Sedang : ditambah 20% dari kebutuhan basal

Berat : ditambah 30% dari kebutuhan basal

Tabel 3.3. Klasifikasi asupan energi

Asupan energi (kkal/hari)	Interpretasi
< 80% KET	Kurang
80 – 120% KET	Cukup
>120% KET	Lebih

Sumber: telah diolah kembali dari WNPG, 2004⁶⁶

B. Asupan Lemak

Asupan lemak adalah jumlah lemak total yang dikonsumsi dalam makanan sehari-hari. Asupan lemak harian dipersentasekan terhadap KET

masing-masing subyek kemudian diinterpretasikan sesuai anjuran, seperti pada tabel 3.4.

Tabel 3.4. Klasifikasi asupan lemak

Asupan lemak (kkal/hari)	Interpretasi
< 25% KET	Kurang
25 – 35% KET	Cukup
>35% KET	Lebih

Sumber: telah diolah kembali dari NCEP ATP III, 2002¹⁰

C. Asupan kolesterol

Asupan kolesterol adalah jumlah kolesterol yang dikonsumsi dalam makanan per hari, kemudian diambil rata-rata dan diinterpretasikan sesuai tabel 3.5.

Tabel 3.5. Klasifikasi asupan kolesterol

Asupan kolesterol (mg/hari)	Interpretasi
<200	Cukup
>200	Lebih

Sumber: telah diolah kembali dari NCEP ATP III, 2002¹⁰

D. Asupan serat

Asupan serat adalah jumlah yang dikonsumsi dalam makanan per hari, kemudian diambil rata-rata dan diinterpretasikan sesuai tabel 3.6.

Tabel 3.6. Klasifikasi asupan serat

Asupan serat (gram/ hari)	Interpretasi
< 20	Kurang
20 – 30	Cukup

Sumber: telah diolah kembali dari NCEP ATP III, 2002¹⁰

E. Asupan polifenol

Asupan polifenol adalah jumlah asupan polifenol yang terkandung dalam bahan perlakuan (300 gram/hari jus anggur) dan diet sehari-hari. Pada penelitian ini kandungan polifenol yang didapat dari dari jus anggur ±

588 mg per hari. Dari asupan sehari-hari, kandungan polifenol dalam masing-masing bahan makanan dan minuman dianalisis berdasarkan penelitian yang telah dilakukan,²⁶ dan data diolah secara manual dengan menggunakan kalkulator.

6. Penyuluhan TLC

Penyuluhan TLC adalah kegiatan memberikan penjelasan tentang pola diet dan aktivitas fisik sesuai dengan anjuran NCEP-ATP III.¹⁰

7. Jus anggur

Jus anggur pada penelitian ini adalah jus dari buah 300 gram buah anggur segar (kandungan polifenol \pm 588 mg) jenis *Red Globe*, kulit dan biji diblender bersama buah. Jus anggur diberikan kepada subyek tanpa penambahan gula, air, atau bahan tambahan lain.

8. Kolesterol total serum batas tinggi

Penilaian kadar kolesterol total batas tinggi mengikuti kriteria NCEP-ATP III¹⁰, yaitu 200 – 239 mg/dL.

9. NO serum.

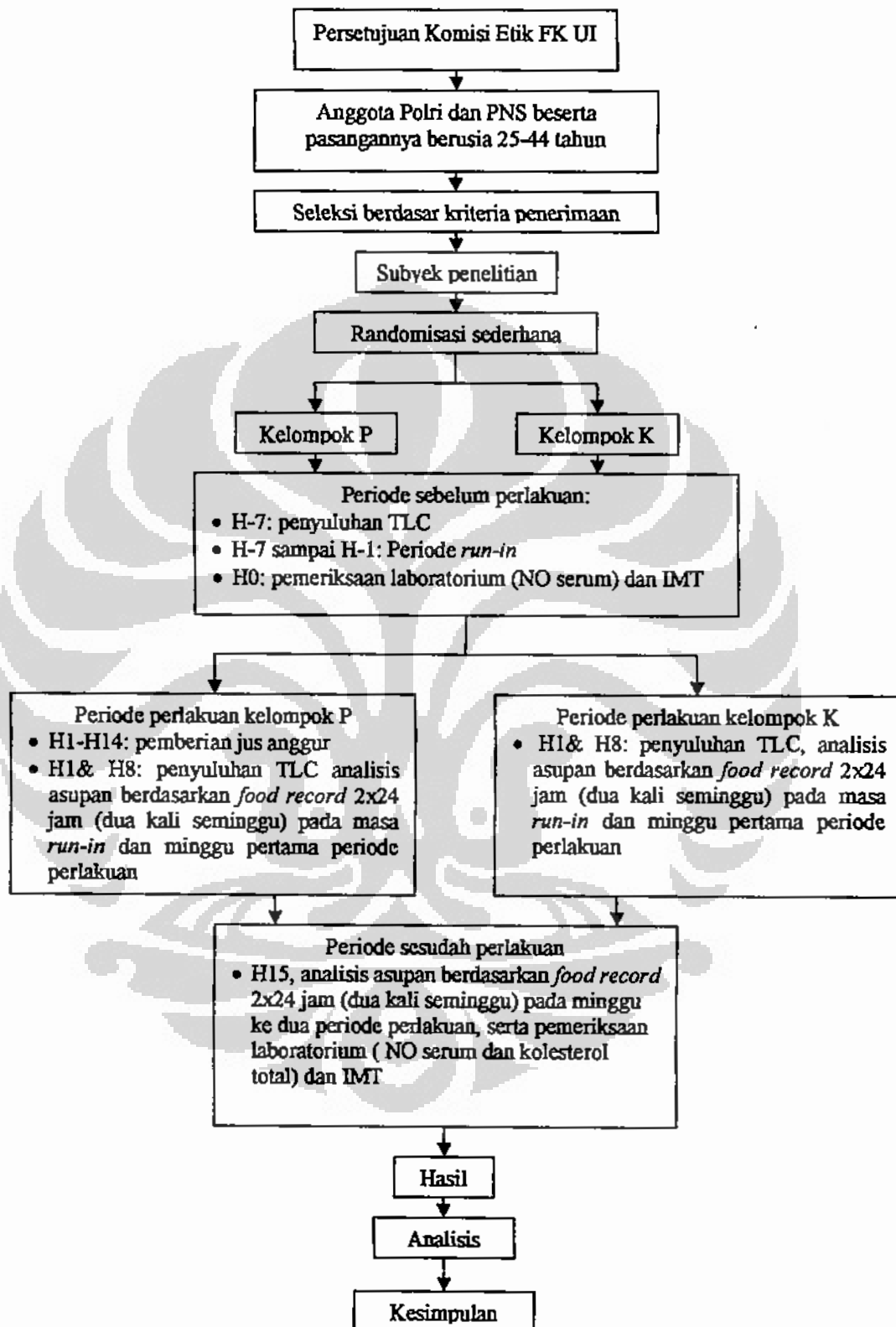
Kadar NO serum adalah kadar total nitrat dan nitrit plasma yang diukur dengan menggunakan kit pemeriksaan *Colorimetric Griess* merk *Cayman Chemical*.

Tabel 3.7. Interpretasi Kadar NO serum

Kadar	Nilai Normal	Interpretasi
NO serum	< 30	Rendah
(μ mol/L)	\geq 30	Normal

Sumber: telah diolah dari Roosevelt dkk⁴⁶

3.10. Kerangka operasional



3.11. Variabel yang diteliti dan indikatornya

Tabel 3.8 menunjukkan variabel-variabel dan indikator yang diteliti.

Tabel 3.8. Indikator Matriks

Variabel	Indikator	Skala	Metode	Kepustakaan
Karakteristik	1. Usia 2. Jenis kelamin 3. Riwayat hiperkolesterolemia keluarga 4. Aktivitas fisik	Rasio/ordinal Nominal Nominal Rasio/ordinal	Wawancara	Mantoye, 1996
Status gizi	IMT	Rasio/ordinal	Pengukuran antropometrik	WHO-WRPO, 2000
Asupan zat gizi a. Energi b. Lemak c. Kolesterol d. Serat d. Polifenol	Kuantitas asupan	Rasio/ordinal	<i>Food record</i> 2x24 jam	NCEP-ATP III, 2002 Brat, 2006
Disfungsi endotel	Kadar NO serum	Rasio	<i>Colorimetric Griess Assays</i>	Freedman, 2001
Kadar kolesterol	Kadar kolesterol total serum	Rasio	<i>Enzymatic</i>	Castilla, 2006

BAB 4

HASIL PENELITIAN

4.1. Seleksi Subyek Penelitian

Proses seleksi pada penelitian ini diikuti oleh 278 orang. Seleksi berdasarkan kriteria penerimaan didapatkan 158 orang yang sesuai dengan kriteria yang ditetapkan dan menyatakan bersedia mengikuti penelitian. Tahap berikutnya dilakukan seleksi berdasarkan kriteria penolakan melalui pemeriksaan laboratorium yang diikuti hanya oleh 128 orang, dan didapatkan 91 orang yang tidak sesuai dengan kriteria penelitian, sehingga jumlah subyek yang dapat dijadikan sampel penelitian adalah 37 orang. Dari 37 subyek tersebut satu orang mengundurkan diri karena mendapatkan penugasan ke luar daerah. Meskipun demikian, jumlah ini sudah sesuai dengan jumlah besar sampel minimal yang dibutuhkan yaitu besar sampel minimal berjumlah 32 subyek, yang bila ditambah dengan *drop out* sebesar 10%, menjadi 36 subyek.

Alokasi subyek penelitian dilakukan dengan cara randomisasi sederhana menggunakan tabel random, dan didapatkan 18 subyek untuk masing-masing kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

Pada periode *run-in* satu subyek dalam kelompok kontrol mengundurkan diri karena mendapatkan penugasan ke luar daerah, sehingga jumlah subyek dalam kelompok kontrol menjadi 17 subyek. Tingkat kehadiran subyek selama periode perlakuan pada kelompok perlakuan sebesar 100%, sedangkan kelompok kontrol sebesar 82%. Pada akhir periode perlakuan, tiga orang subyek dari kelompok kontrol *drop-out* karena tidak dapat hadir untuk pengukuran berat badan, IMT, serta pengambilan darah untuk pemeriksaan kadar NO dan kolesterol total serum sesudah perlakuan.

4.2. Karakteristik Subyek Penelitian

Tabel 4.1 memperlihatkan karakteristik subyek penelitian kelompok perlakuan dan kontrol berdasarkan jenis kelamin, riwayat hiperkolesterolemia dalam keluarga, usia, dan aktivitas fisik.

Tabel 4.1. Karakteristik Subyek Penelitian

Variabel	Perlakuan (n=18)	Kontrol (n=17)	p
Jenis kelamin n (%)			
Laki-laki	4 (22,2%)	4 (23,5%)	0,85 ^c
Perempuan	14 (77,8%)	13 (76,5%)	
Riwayat hiperkolesterolemia dalam keluarga n (%)			
Ada	8 (44,4%)	7 (41,2%)	0,63 ^c
Tidak ada	10 (55,6%)	10 (58,8%)	
Usia (tahun)	35,50 ± 5,35	36,65 ± 5,30	0,96 ^t
25 - 34	8 (44,4%)	7 (41,2%)	0,11 ^m
35 - 44	10 (55,6%)	10 (58,8%)	
Aktivitas fisik	36,00 (24,00-60,00)	27,00 (16,00-39,00)	
Rendah	3 (16,7%)	8 (47,1%)	
Cukup	8 (44,4%)	5 (29,4%)	
Rata-rata	5 (27,8%)	2 (11,8%)	
Baik	1 (5,6%)	1 (5,9%)	
Sangat baik	1 (5,6%)	1 (5,9%)	

c = uji chi-square; t = uji t tidak berpasangan; m = uji mann-whitney

Jumlah subyek penelitian adalah 35 subyek, yang sebagian besar (77,1%) terdiri dari perempuan. Didapatkan 42,9% subyek mempunyai riwayat hiperkolesterolemia dalam keluarga. Rata-rata usia subyek penelitian adalah 35,57 ± 5,20 tahun, dan tidak ada perbedaan bermakna diantara kedua kelompok. Sebanyak 24 (68,5%) subyek mempunyai aktivitas fisik di bawah nilai rata-rata.

4.3. Indeks Massa Tubuh (IMT)

Tabel 4.2 memperlihatkan tidak ada perbedaan bermakna rerata IMT antara kelompok perlakuan dan kontrol pada sebelum perlakuan. Rerata IMT pada kedua kelompok menurun sesudah perlakuan, meskipun tidak berbeda bermakna.

Tabel 4.2. Tabel Rerata dan sebaran IMT Sebelum dan Sesudah Perlakuan

Variabel	Perlakuan	Kontrol	p
IMT (kg/m ²)			
H0	24,61±2,58	23,47±4,09	0,34 ^t
- 18,5-22,9 n(%)	5 (27,8)	8 (47,1)	
- 23-24,9 n(%)	5 (27,8)	3 (17,6)	
- 25-29,9 n(%)	8 (44,4)	6 (35,3)	
H15	24,48±2,59	23,39±4,02	0,36 ^t
- 18,5-22,9 n(%)	5 (27,8)	8 (57,1)	
- 23-24,9 n(%)	5 (27,8)	0	
- 25,29,9 n(%)	8 (44,4)	6 (42,9)	

t = uji t tidak berpasangan

4.4. Asupan Energi dan Zat Gizi

Tabel 4.3 memperlihatkan asupan energi, lemak, kolesterol, serat, dan polifenol pada kedua kelompok saat sebelum (H0), minggu pertama (H8) dan minggu ke dua (H15) perlakuan. Pada H0 tidak didapatkan perbedaan bermakna antara kedua kelompok. Asupan energi, lemak, dan kolesterol pada kedua kelompok saat H0 dibandingkan dengan H8 tampak meningkat, kemudian menurun kembali saat H15 terutama pada kelompok kontrol.

Persentase asupan energi terhadap kebutuhan energi total (KET) pada kedua kelompok saat H0 tergolong kurang (< 80% KET), saat H8 tergolong cukup (80-120% KET), namun kemudian pada kelompok kontrol terjadi penurunan saat H15 dan tergolong kurang.

Untuk asupan lemak, persentase asupan lemak terhadap KET pada kedua kelompok saat H0, H8, dan H15 tergolong asupan lemak cukup (25% - 35% KET). Nilai median asupan kolesterol pada kelompok perlakuan dan kontrol saat H0, H8, dan H15 tergolong cukup (< 200 mg/hari), serta didapatkan perbedaan bermakna ($p=0,03$) antara kedua kelompok pada H15. Asupan serat pada kedua kelompok saat H0, H8, dan H15 tergolong kurang bila dibandingkan dengan asupan serat yang dianjurkan (20 – 30 gram/ hari).

Tidak didapatkan perbedaan pada kedua kelompok untuk asupan polifenol pada H0, namun meningkat dan menjadi berbeda bermakna ($p=0,00$) pada H8 dan H15.

Tabel 4.3. Asupan Energi, Lemak, Kolesterol, Serat dan Polifenol.

Variabel	Perlakuan	Kontrol	p
Energi (kkal) {% asupan energi}			
H0	1144,90(782,31-1395,28) {66,54(55,05-94,41)}	1009,35(765,43-1318,14) {62,40(53,31-81,98)}	0,79 ^m 0,72 ^m
H8	1424,05(1069,18-1864,25) {92,21±26,73}	1296,03(1039,42-1564,41) {85,40(69,50-98,18)}	0,47 ^m 0,51 ^m
H15	1456,85±378,38 {90,36±26,73}	1128,75(979,03-1693,58) {73,52(61,56-103,97)}	0,12 ^m 0,09 ^m
Lemak (g) {% asupan lemak}			
H0	52,25(30,96-62,51) {29,67(20,25-37,00)}	39,15(31,00-52,66) {21,95(18,71-32,75)}	0,41 ^m 0,49 ^m
H8	52,10(38,89-75,69) {32,00(20,79-44,15)}	49,98(42,35-63,28) {29,99(25,66-36,59)}	0,82 ^m 0,90 ^m
H15	57,80(50,13-76,49) {36,27(26,47-40,89)}	45,23(34,91-73,56) {27,74(20,73-40,89)}	0,31 ^m 0,11 ^m
Kolesterol (mg)			
H0	130,70(78,78-176,78)	123,05(97,13-167,70)	0,79 ^m
H8	191,15(150,73-248,35)	146,60(115,65-212,05)	0,19 ^m
H15	179,10 (154,70-213,53)	124,85 (86,69-265,25)	0,03 ^{*m}
Serat (g)			
H0	5,48(4,49-8,19)	7,05(5,20-8,40)	0,31 ^m
H8	9,25(7,39-13,05)	7,45 (6,48-8,78)	0,06 ^m
H15	7,45 (6,48-8,78)	6,28 (3,48-7,70)	0,06 ^m
Polifenol (mg)			
H0	71,09 (20,49-106,54)	45,90 (34,83-67,01)	0,87 ^m
H8	620,50 (593,55-690,88)	48,28 (18,16-87,11)	0,00 ^{*m}
H15	623,68 (608,09-714,85)	63,12 (18,06-100,31)	0,00 ^{*m}

* = bermakna; m = uji mann-whitney;

4.5. Kadar NO serum

Tabel 4.5 memperlihatkan kadar NO serum sebelum dan sesudah perlakuan. Kadar NO serum sesudah perlakuan pada kedua kelompok, dengan peningkatan yang lebih tinggi pada kelompok perlakuan, namun tidak ada perbedaan bermakna baik antar (*between*) maupun dalam (*within*) kelompok.

Tabel 4.4. Kadar NO serum Sebelum dan Sesudah Perlakuan.

Variabel	Perlakuan		Kontrol		p
NO serum ($\mu\text{mol/L}$)		p		p	
H0	8,37(5,66-13,28)	0,11 ^w	8,28(7,38-10,73)	0,18 ^w	0,92 ^m
H15	11,76(7,74-13,39)		9,57(7,71-11,86)		0,30 ^m

m = uji mann-whitney, w = uji wilcoxon

4.6. Kadar Kolesterol Total Serum

Tabel 4.4. memperlihatkan kadar kolesterol total antara kelompok perlakuan dan kontrol, sebelum ($p=0.09$) dan sesudah ($p=0.67$) perlakuan yang didapatkan tidak berbeda bermakna. Nilai rerata kadar kolesterol total serum pada kedua kelompok sesudah perlakuan masih dalam kategori batas tinggi.

Tabel 4.5. Tabel Kadar Kolesterol Total Serum Sebelum dan Sesudah Perlakuan

Variabel	Perlakuan	Kontrol	p
Kolesterol total serum (mg/dL)			
H0	224 (208,25-229,25)	212 (206,00-227,50)	0,09 ^m
H15	208,56+16,55	206,00+16,23	0,67 ^t

* = bermakna; t = uji t tidak berpasangan; m = uji mann-whitney

BAB 5 PEMBAHASAN

Telah dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh jus anggur terhadap kadar kolesterol total dan NO serum pada subyek berusia 25 - 44 tahun dengan kadar kolesterol total batas tinggi. Penelitian ini adalah suatu *field trial* yang dilakukan pada warga asrama Polri Cipinang, dengan membandingkan kelompok yang mendapatkan jus anggur dari 300 gram buah anggur segar per hari selama 14 hari disertai pemberian penyuluhan tentang TLC dengan kelompok yang hanya mendapatkan penyuluhan tentang TLC saja.

5.1. Keterbatasan Penelitian

Metode Penelitian

Kelompok kontrol dalam penelitian ini tidak mendapatkan plasebo yang merupakan salah satu teknik ketersamaran,⁵² karena kesulitan dalam pembuatan produk plasebo.

Jumlah polifenol dalam jus anggur yang diberikan kepada subyek dihitung berdasarkan tabel bahan makanan sumber polifenol,²⁶ bukan pengukuran secara laboratorik, karena belum adanya standar baku pengukuran kadar polifenol.

Penilaian Asupan Zat Gizi

Penilaian asupan zat gizi dalam penelitian ini dilakukan menggunakan metode *food record*. Keterbatasan metode ini adalah kecenderungan subyek untuk tidak mencatat langsung makanan yang dikonsumsi. Pada minggu pertama, beberapa subyek bahkan mencatat makanan yang dikonsumsinya pada saat lembar *food record* akan diserahkan kembali, sehingga kemungkinan tidak akurat dan dapat menyebabkan bias.⁵³

Penilaian asupan polifenol menggunakan tabel bahan makanan sumber polifenol yang didapatkan dari penelitian di luar negeri,²⁶ sehingga beberapa bahan makanan yang dikonsumsi oleh subyek penelitian tidak semuanya terdapat dalam tabel tersebut.

Pemeriksaan Laboratorium

Pemeriksaan kadar NO serum dilakukan dengan metode *Colorimetric Griess*, yaitu berdasarkan jumlah nitrat dan nitrit sebagai metabolit antara NO (bukan NO yang sebenarnya), karena NO berbentuk gas dan mempunyai waktu paruh sangat pendek.

5.2. Seleksi Subyek Penelitian

Asrama Polri Cipinang dihuni oleh sekitar 300 kepala keluarga, yang terdiri dari anggota Polri maupun PNS beserta keluarganya. Tingkat ekonomi warga di tempat tersebut tergolong menengah ke bawah, dengan tingkat pendidikan bervariasi dari tamat Sekolah Dasar sampai dengan tamat Perguruan Tinggi. Setelah dilakukan seleksi berdasarkan kriteria penerimaan melalui wawancara, pemeriksaan status gizi menurut IMT, dan pemeriksaan tekanan darah didapatkan 158 subyek.

Pemilihan subyek berdasarkan kriteria usia 25 - 44 didasarkan atas pertimbangan adanya kecenderungan peningkatan kadar kolesterol pada usia tersebut, yang berhubungan dengan penurunan fungsi endotel pembuluh darah dan peningkatan risiko terjadinya PKV.^{5,10,57} Hal ini disebabkan karena dengan bertambahnya usia terjadi penurunan kadar antioksidan serta peningkatan radikal bebas dalam tubuh.^{58,59} Ketidakseimbangan antara antioksidan dan radikal bebas menyebabkan terjadinya stres oksidatif, yang kemudian akan menyebabkan penurunan bioavailabilitas NO, penurunan fungsi endotel pembuluh darah, serta memicu terjadinya aterosklerosis.^{3,59}

Kriteria IMT pada subyek penelitian ini adalah kelompok kategori normal, berisiko dan obes I. Hal ini dilakukan karena kesulitan di lapangan untuk mencari subyek yang mempunyai IMT normal saja berdasarkan kriteria usia yang ditetapkan. Pada SKRT 2004 diperlihatkan bahwa pada usia 25 - 44 tahun, IMT cenderung meningkat.⁴ Beberapa peneliti juga mendapatkan adanya hubungan antara pertambahan usia dengan peningkatan berat badan.^{57,60} Kategori IMT obes II ($\geq 30 \text{ kg/m}^2$) tidak dimasukkan dalam kriteria subyek penelitian karena pada

IMT tersebut telah terjadi penurunan fungsi endotel yang sangat bermakna, yang merupakan faktor risiko tinggi terjadinya PKV.^{3,61}

Penelitian ini memilih subyek yang tidak mempunyai kebiasaan merokok karena diketahui merokok dapat meningkatkan radikal bebas dalam tubuh dan menurunkan bioavailabilitas NO.⁴⁹ Selain itu dipilih subyek dengan tekanan darah di bawah 140/90, karena pada hipertensi (tekanan darah \geq 140/90 mmHg) terjadi penurunan bioavailabilitas NO.³ Suplemen antioksidan atau vitamin^{8,13} serta obat-obat yang mempengaruhi metabolisme lemak⁹ juga dapat mempengaruhi kadar kolesterol total dan NO serum sehingga dipilih subyek yang tidak sedang mengonsumsi obat-obatan tersebut.

Seleksi tahap berikutnya dilakukan melalui pemeriksaan laboratorium berdasarkan kriteria penolakan, yang diikuti oleh 128 subyek dari 158 subyek pada seleksi pertama karena 30 subyek lainnya tidak hadir. Kadar kolesterol total \geq 240 mg/dL atau lebih tidak dipilih karena berdasarkan NCEP ATP III 2002, individu yang tergolong dalam kategori tersebut sudah memerlukan terapi obat hiperkolesterolemia. Selain itu, subyek dengan diabetes melitus (gula darah puasa \geq 126 mg/dL), maupun penyakit kronik lainnya seperti kelainan fungsi hati (SGOT \geq 27 U/L atau SGPT \geq 34 U/L) serta kelainan fungsi ginjal (ureum $>$ 43 mg/dL atau kreatinin $>$ 0,9 mg/dL) tidak dimasukkan ke dalam kriteria subyek penelitian karena pada kondisi tersebut terjadi gangguan metabolisme yang akan menyebabkan peningkatan stres oksidatif dan penurunan fungsi endotel pembuluh darah, sehingga dapat menimbulkan bias dalam penelitian ini.

5.3. Karakteristik Subyek Penelitian

Data karakteristik subyek penelitian kedua kelompok sebelum perlakuan adalah homogen, hal ini merupakan salah satu syarat dalam melakukan uji klinik agar didapatkan hasil yang sah. Salah satu cara yang digunakan dalam penelitian ini adalah alokasi subyek dengan cara randomisasi sederhana menggunakan tabel random, sehingga perbedaan yang terjadi pada akhir penelitian diharapkan merupakan akibat perlakuan yang diberikan.

5.3.1. Jenis Kelamin

Jumlah subyek pada penelitian ini adalah 35 orang, terdiri dari 27 subyek perempuan (77,1%) dan delapan subyek laki-laki (22,8%). Berdasarkan SKRT 2004 didapatkan bahwa prevalensi hiperkolesterolemia pada perempuan lebih tinggi dibandingkan laki-laki. Pada beberapa penelitian^{10,18,20} tidak didapatkan adanya perbedaan respon antara laki-laki dan perempuan terhadap terapi untuk menurunkan kadar kolesterol darah, oleh karena itu, subyek pada penelitian ini tidak dikhususkan hanya pada satu jenis kelamin saja. Agar distribusi jenis kelamin merata antar kedua kelompok maka telah dilakukan randomisasi sederhana untuk alokasi subyek penelitian.

5.3.2. Riwayat hiperkolesterolemia dalam keluarga

Disfungsi endotel dapat dipengaruhi oleh polimorfisme genetik. Pada individu dengan *familial hypercholesterolemia* didapatkan reseptor LDL yang lebih rendah dibandingkan normal, sehingga lebih mudah terjadi peningkatan LDL teroksidasi. LDL yang teroksidasi akan meningkatkan produksi radikal superoksida yang kemudian akan menurunkan bioavailabilitas NO.^{40,41} Sejumlah 42,86% subyek penelitian mempunyai riwayat keluarga hiperkolesterolemia, berdasarkan wawancara ada tidaknya keluarga kandung subyek yang menderita hiperkolesterolemia atau penyakit kardiovaskuler, serta usia saat diketahuinya penyakit tersebut.⁴¹

5.3.3. Usia

Rentang usia subyek pada penelitian ini adalah 25 - 44 tahun. Rerata usia kelompok perlakuan dan kontrol tidak menunjukkan perbedaan bermakna. Bila subyek penelitian dikelompokkan berdasarkan kelompok usia dalam SKRT 2004, didapatkan jumlah subyek berusia antara 25 - 34 tahun adalah 15 subyek (42,9%), dan jumlah subyek berusia antara 35 - 44 tahun adalah 20 subyek (57,1%). Hasil

ini sesuai dengan SKRT 2004 yang menunjukkan prevalensi hiperkolesterolemia meningkat sejalan dengan bertambahnya usia.

Pertambahan usia berhubungan dengan penurunan fungsi endotel.^{57,61} Hal ini disebabkan karena dengan bertambahnya usia terdapat kecenderungan peningkatan berat badan^{4,58} maupun peningkatan radikal bebas⁶⁰ dan penurunan kadar antioksidan⁵⁸, sehingga menyebabkan stres oksidatif. Stres oksidatif dapat meningkatkan LDL teroksidasi serta menurunkan bioavailabilitas NO, yang selanjutnya menyebabkan disfungsi endotel pembuluh darah dan meningkatkan risiko aterosklerosis.^{3,62}

5.3.4. Aktivitas Fisik

Pada penelitian ini, aktivitas fisik merupakan variabel perancu yang dikontrol sehingga subyek dianjurkan untuk tetap melakukan aktivitas fisik seperti biasa. Sebagian besar (68,5%) subyek penelitian mempunyai indeks aktivitas fisik di bawah rata-rata (41 – 60), hal ini mungkin karena sebagian besar subyek penelitian adalah ibu rumah tangga yang tidak melakukan olahraga secara teratur. Aktivitas fisik yang rendah (*physical inactivity*) dapat menyebabkan penurunan bioavailabilitas NO akibat penurunan ekspresi enzim eNOS,⁴⁸ dan dapat menyebabkan disfungsi endotel yang akan berlanjut menjadi aterosklerosis dan PKV.^{3,41}

5.3.5. Indeks Massa Tubuh (IMT)

Sebagian besar (60%) subyek penelitian mempunyai IMT yang tergolong berisiko dan obes I. Sesudah perlakuan, 10 (55,6%) subyek dari kelompok perlakuan dan 11 (78,6%) subyek dari kelompok kontrol mengalami penurunan berat badan, sehingga terjadi penurunan rerata IMT pada kedua kelompok. Hasil ini kemungkinan disebabkan karena subyek mulai belajar mematuhi anjuran yang diberikan saat penyuluhan TLC untuk mengatur pola dietnya.

IMT mempunyai korelasi negatif dengan bioavailabilitas NO dalam darah.^{60,61}

5.4. Asupan Energi dan Zat Gizi

Asupan energi dan zat gizi subyek penelitian sebelum perlakuan (H0) didapatkan dari analisis asupan berdasarkan *food record* yang diberikan pada masa *run-in*. Sebelum pelaksanaan masa *run-in*, dilakukan penyuluhan TLC yang pertama disertai dengan pembagian brosur dan penjelasan untuk membatasi asupan bahan makanan yang mengandung polifenol (lampiran 7). Asupan energi, lemak, kolesterol, serat, dan polifenol saat H0 tidak berbeda bermakna di antara kedua kelompok.

5.4.1. Asupan Energi

Asupan energi pada kedua kelompok saat H0 lebih rendah bila dibandingkan dengan asupan energi saat minggu pertama periode perlakuan (H8). Hal ini kemungkinan disebabkan karena subyek belum mengerti benar cara pencatatan ke dalam lembar *food record*, sehingga tidak semua makanan dan minuman yang dikonsumsi dicatat dalam lembar *food record*. Meskipun demikian, asupan energi pada kedua kelompok menurun saat minggu ke dua perlakuan (H15) dibandingkan dengan asupan energi saat H8. Hal inilah yang mungkin menyebabkan terjadinya rerata penurunan berat badan sekitar 0,3 kg pada subyek di kedua kelompok, yang menyebabkan penurunan rerata IMT.

Pada H8 dan H15, terdapat perbedaan asupan energi antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan sekitar 200 kkal, meskipun tidak berbeda bermakna. Perbedaan asupan energi tersebut sesuai dengan adanya penambahan jumlah asupan energi yang berasal dari jus anggur yang diberikan kepada kelompok perlakuan yaitu sekitar 207 kkal per 300 gram anggur per hari. Penambahan asupan energi tersebut menyebabkan persentase asupan energi terhadap KET pada kelompok perlakuan saat H8 dan H15 tergolong cukup (80-120% KET), sedangkan pada kelompok kontrol tergolong cukup saat H8 kemudian menurun di H15 dan tergolong kurang (<80% KET).

Penurunan asupan di kedua kelompok selama perlakuan mungkin disebabkan karena subyek mulai belajar mengatur pola dietnya sesuai dengan anjuran yang diberikan dalam penyuluhan TLC.

5.4.2. Asupan Lemak

Asupan lemak saat H8 dan H15 pada kedua kelompok cenderung meningkat, bila dibandingkan H0. Hal ini juga mungkin disebabkan karena pencatatan asupan lemak saat H0 yang kurang tepat. Walaupun demikian, asupan lemak total subyek penelitian dibandingkan dengan KET pada kedua kelompok dalam batas yang dianjurkan yaitu 25 – 35% KET.¹⁰

5.4.3. Asupan Kolesterol

Asupan kolesterol pada kelompok perlakuan dan kontrol saat H0, H8, dan H15 masih dalam batas yang dianjurkan yaitu kurang dari 200 mg/ hari. Bahkan pada kelompok kontrol tampak lebih patuh dalam melaksanakan anjuran yang diberikan dalam penyuluhan TLC, salah satunya yaitu mengurangi asupan kolesterol dalam diet sehari-hari, yang dibuktikan dengan adanya penurunan asupan kolesterol yang berbeda bermakna bila dibandingkan dengan kelompok perlakuan saat H15.

Asupan kolesterol ini menjadi penting karena dari hasil penelitian pada hewan coba didapatkan bahwa dengan pemberian asupan kolesterol yang tinggi akan menyebabkan penurunan kadar NO serum hewan coba, dan terjadi sebaliknya bila asupan kolesterol diberikan dalam jumlah yang normal.⁹

5.4.4. Asupan Serat

Asupan serat pada kelompok perlakuan saat H8 dan H15 lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol, namun tidak berbeda bermakna. Hal ini karena pemberian jus anggur kepada kelompok perlakuan yang mengandung serat kurang lebih 2,7 gram per 300 gram buah anggur per hari.²⁶ Meskipun demikian, asupan serat pada kelompok perlakuan dan kontrol selama periode perlakuan masih tetap

kurang bila dibandingkan asupan yang dianjurkan yaitu 20 – 30 gram/ hari.¹⁰ Hal ini mungkin disebabkan karena adanya pembatasan untuk mengonsumsi buah dan sayur yang mengandung polifenol untuk menghindari terjadinya bias, dan kemungkinan juga sebagian besar subyek kurang mengonsumsi buah dan sayur dalam diet sehari-hari.

5.4.5. Asupan Polifenol

Penilaian jumlah asupan polifenol dilakukan secara manual yaitu dengan menghitung jumlah polifenol yang terkandung dalam bahan makanan yang dikonsumsi, seperti buah, sayur, serta minuman teh dan kopi. Untuk mendapatkan nilai polifenol maka tiap 100 gram bahan makanan atau tiap 200 mL minuman dikonversi dengan tabel bahan makanan yang mengandung polifenol. Kesulitan dalam menghitung jumlah polifenol ditemui apabila subyek mengonsumsi jenis bahan makanan sumber yang tidak terdapat dalam daftar bahan makanan sumber polifenol (misalnya leunca), atau subyek mengonsumsi makanan olahan (seperti gado-gado), sehingga perhitungan yang dilakukan menjadi *overestimate* atau *underestimate*. Meskipun demikian, asupan polifenol didapatkan berbeda bermakna selama perlakuan, karena adanya tambahan polifenol dalam jus anggur yang diberikan kepada kelompok perlakuan sebesar 588 mg per hari.

5.5. Kadar Nitric oxide (NO) serum

Sebelum perlakuan didapatkan kadar NO serum pada kelompok perlakuan 8,37 (5,66-13,28) $\mu\text{mol/L}$ dan kelompok kontrol 8,28 (7,38-110,73) $\mu\text{mol/L}$, yang nilainya lebih rendah dibandingkan nilai NO normal ($\geq 30 \mu\text{mol/L}$). Beberapa penelitian sebelumnya mendapatkan kadar NO serum pada subyek hiperkolesterolemia lebih rendah dibandingkan nilai normal atau dibandingkan kadar NO serum pada subyek sehat.^{8,9} Penurunan kadar NO serum pada penderita hiperkolesterolemia disebabkan karena terjadinya peningkatan ROS yang dapat menyebabkan kerusakan oksidatif kofaktor enzim eNOS, yaitu *tetrahydrobiopterin* (H₄B), sehingga dapat menurunkan bioavailabilitas NO.^{44,50}

Rendahnya kadar NO serum pada kedua kelompok sebelum perlakuan mungkin juga diakibatkan karena aktivitas fisik pada kedua kelompok di bawah nilai rata-rata, karena pada aktivitas fisik yang rendah terjadi penurunan ekspresi enzim eNOS sehingga terjadi penurunan bioavailabilitas NO.⁴⁸ Hal lain yang dapat menjadi penyebab adalah IMT sebagian besar subyek termasuk dalam kategori berisiko dan obes I, karena IMT diketahui mempunyai korelasi negatif dengan bioavailabilitas NO dan fungsi endotel.^{61,62}

Kadar NO serum kedua kelompok sesudah perlakuan mengalami peningkatan dan lebih tinggi pada kelompok perlakuan meskipun tidak berbeda bermakna. Setelah diuji dengan uji non parametrik Wilcoxon yang bertujuan untuk menilai perbedaan kadar NO serum sebelum dan sesudah perlakuan dalam masing-masing kelompok, juga tidak didapatkan peningkatan bermakna kadar NO serum. Hasil dalam penelitian ini berbeda bila dibandingkan dengan hasil penelitian dengan rancangan *pre post test* oleh Freedman dkk²⁰ dan Stein dkk²¹ yang memberikan jus anggur selama 14 hari, dan mendapatkan peningkatan kadar NO secara bermakna. Dalam penelitian ini perkiraan kandungan polifenol dalam jus anggur yang diberikan adalah sekitar 588 mg/ hari, lebih tinggi dibandingkan dengan kandungan polifenol dalam penelitian Freedman dkk dengan pertimbangan bahwa subyek dalam penelitian ini mempunyai kadar kolesterol total dalam kategori batas tinggi, sedangkan subyek pada penelitian Freedman dkk adalah orang sehat, berusia 20 – 45 tahun. Namun jumlah polifenol dalam penelitian ini lebih rendah bila dibandingkan dengan penelitian Stein dkk, di mana subyek dalam penelitiannya adalah penderita dislipidemia dan berusia sekitar 60 tahun.

Perbedaan hasil ini kemungkinan disebabkan karena kandungan polifenol dalam buah anggur ini dihitung hanya berdasarkan kandungan polifenol buah anggur dalam tabel bahan makanan sumber polifenol, yaitu 196 mg/ 100 gram buah anggur,²⁶ bukan berdasarkan pemeriksaan laboratorik untuk mengukur kandungan polifenol dalam buah anggur *Red Globe* yang digunakan dalam penelitian ini. Sedangkan polifenol yang terkandung dalam buah anggur merah

bervariasi dari 36 mg/ 100 gram sampai dengan 275,5 mg/ 100 gram.²⁶ Sehingga ada kemungkinan jumlah aktual asupan polifenol dalam jus anggur yang diberikan tidak sebesar hasil perhitungan. Selain itu, proses transportasi, penyimpanan, serta pembuatan jus anggur dapat berpengaruh terhadap kandungan polifenolnya karena polifenol mudah teroksidasi menjadi bentuk polimer yang sulit diabsorpsi.^{8,26,63}

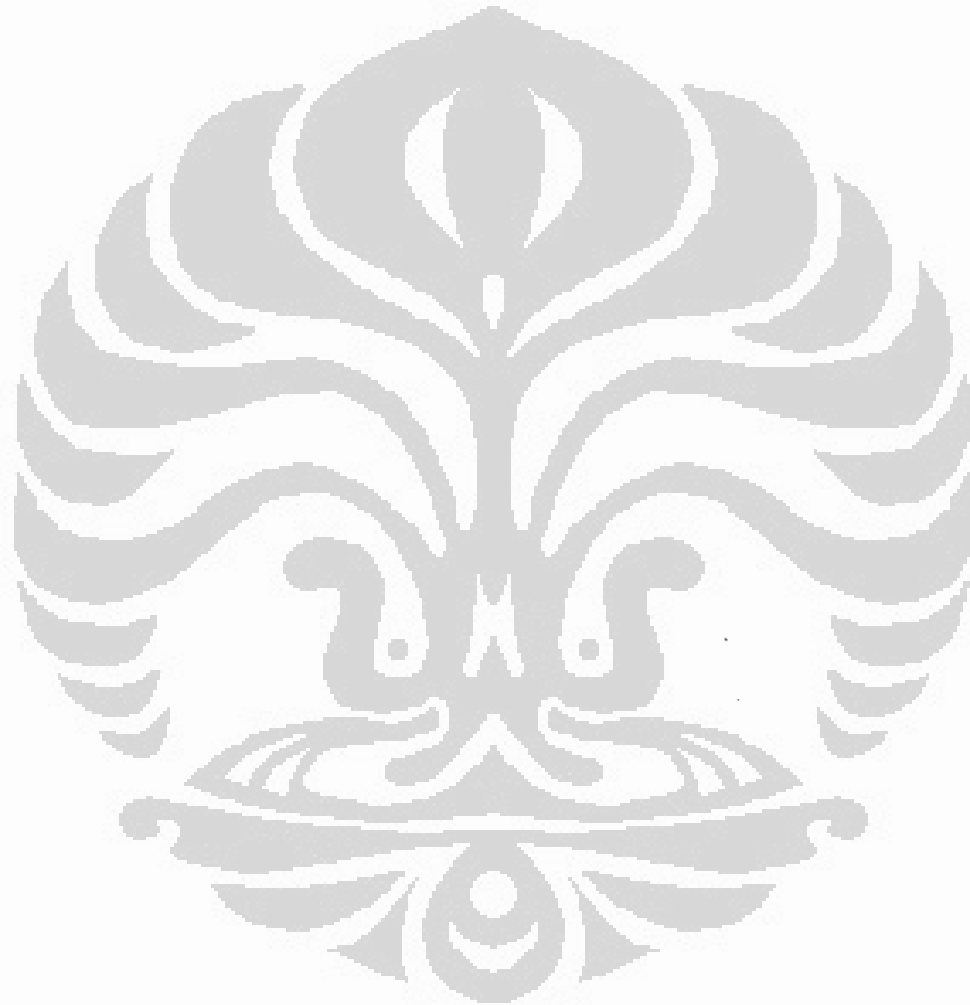
Penelitian ini juga menggunakan jus yang dibuat secara sederhana (diblender), sedangkan kedua penelitian sebelumnya menggunakan jus anggur botolan hasil produksi pabrik, yang kemungkinan kandungan polifenolnya sudah siap untuk diabsorpsi dan dimetabolisme lebih lanjut sehingga kemampuan antioksidannya cepat bekerja.⁶³ Dengan mempertimbangkan jenis jus yang digunakan serta karakteristik subyek dengan peningkatan kadar kolesterol total, kemungkinan kemampuan antioksidan dari polifenol yang terkandung dalam jus anggur yang diberikan selama 14 hari belum cukup efektif untuk meredam radikal bebas dan meningkatkan bioavailabilitas NO pada dinding pembuluh darah. Hal ini sama dengan hasil penelitian Albers dkk²² yang mendapatkan hasil tidak berbeda bermakna sesudah pemberian jus anggur selama 14 hari pada subyek dengan hiperkolesterolemia, dan berpendapat bahwa intervensi yang dilakukan kurang lama, mengingat pada penderita hiperkolesterolemia sudah terjadi peningkatan stres oksidatif yang bermakna dibandingkan kondisi normal.

Peningkatan kadar NO serum pada kelompok kontrol mungkin disebabkan karena perbaikan pola diet pada kelompok kontrol, terutama penurunan asupan kolesterol. Perbaikan asupan kolesterol diketahui dapat memperbaiki bioavailabilitas NO.⁹ Selain itu, penurunan rerata IMT mungkin juga berpengaruh terhadap peningkatan kadar NO pada kelompok kontrol, karena IMT mempunyai korelasi negatif dengan bioavailabilitas NO.⁶¹

5.6. Kadar Kolesterol Total Serum

Pada penelitian ini juga dilakukan pemeriksaan kadar kolesterol total serum sesudah perlakuan, dan ternyata didapatkan penurunan walaupun tidak berbeda bermakna antara kedua kelompok dan masih dalam kategori batas tinggi.

Penurunan kadar kolesterol total sesudah perlakuan pada kedua kelompok mungkin disebabkan karena perbaikan pola diet subyek penelitian setelah mendapatkan penyuluhan TLC, yang dibuktikan dengan adanya penurunan nilai rerata IMT. Kemungkinan lain penyebab penurunan kadar kolesterol total pada kelompok perlakuan adalah pengaruh pemberian jus anggur, seperti penelitian Castilla dkk¹⁸ yang juga mendapatkan penurunan kadar kolesterol total pada kelompok yang mendapatkan jus anggur selama 14 hari.



BAB 6

RINGKASAN, KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Ringkasan

Disfungsi endotel adalah suatu keadaan yang ditandai dengan penurunan bioavailabilitas dan bioaktivitas NO, yang menyebabkan hilangnya homeostasis dinding pembuluh darah. Salah satu penyebab terjadinya disfungsi endotel adalah peningkatan kadar kolesterol total.⁴³

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menilai pengaruh jus anggur terhadap kadar NO serum pada subyek dengan kadar kolesterol total batas tinggi. Penelitian ini merupakan suatu uji klinik yang dilakukan pada anggota Polri dan PNS beserta pasangannya yang tinggal di asrama Polri Cipinang, berusia 25 – 44 tahun. Pada penelitian ini diberikan jus anggur disertai penyuluhan TLC pada satu kelompok, sedangkan yang lain diberikan penyuluhan TLC saja.

Jumlah subyek yang dapat mengikuti penelitian adalah 35 orang, namun dalam perjalanannya hanya 32 subyek yang berhasil menyelesaikan penelitian. Penentuan alokasi subyek dilakukan dengan cara randomisasi sederhana.

Data diperoleh dari hasil wawancara yang meliputi usia, riwayat hiperkolesterolemia dalam keluarga, dan aktivitas fisik, serta pengukuran antropometri untuk mendapatkan indeks massa tubuh. Data asupan energi, lemak, kolesterol, serat, dan polifenol didapatkan dari analisis *food record* yang dilakukan sebelum perlakuan, minggu pertama dan ke dua periode perlakuan. Pemeriksaan kadar NO dan kolesterol total serum dilakukan sebelum dan sesudah perlakuan.

Data karakteristik subyek penelitian, asupan, dan laboratorium sebelum perlakuan pada kedua kelompok adalah homogen. Rerata usia subyek adalah $35,57 \pm 5,20$ tahun, yang sebagian besar (77,1%) terdiri dari perempuan. Indeks aktivitas fisik sebagian besar subyek penelitian (68,5%) di bawah nilai rata-rata. Sebanyak 60% subyek penelitian mempunyai indeks massa tubuh di atas nilai normal.

Penilaian asupan energi dan zat gizi saat sebelum perlakuan tidak menunjukkan perbedaan bermakna antara kedua kelompok. Persentase asupan energi

dibandingkan dengan kebutuhan energi total selama perlakuan pada kelompok perlakuan tergolong cukup, sedangkan pada kelompok kontrol tergolong cukup saat minggu pertama perlakuan dan tergolong kurang saat minggu ke dua perlakuan. Asupan lemak total kedua kelompok dalam batas yang dianjurkan yaitu 25 – 35% dari kalori total. Asupan kolesterol pada kedua kelompok selama perlakuan sesuai dengan anjuran (200 mg/hari), bahkan pada minggu ke dua perlakuan terjadi penurunan yang bermakna pada kelompok kontrol dibandingkan kelompok perlakuan. Asupan serat di kedua kelompok masih di bawah nilai asupan yang dianjurkan. Asupan polifenol didapatkan perbedaan bermakna antara kedua kelompok di periode perlakuan, yang disebabkan karena kandungan polifenol dalam jus anggur yang diberikan pada kelompok perlakuan.

Nilai rerata indeks massa tubuh pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol sesudah perlakuan terjadi penurunan dibandingkan sebelum perlakuan, namun tidak didapatkan perbedaan bermakna antara kedua kelompok.

Terdapat peningkatan kadar NO serum sesudah perlakuan pada kedua kelompok yang cenderung lebih tinggi pada kelompok perlakuan, walaupun tidak berbeda bermakna. Bahkan terjadi pula penurunan kadar kolesterol total serum pada kedua kelompok sesudah perlakuan, walaupun masih dalam kategori batas tinggi.

6.2. Kesimpulan

Pada penelitian pengaruh pemberian jus anggur terhadap kadar NO serum pada subyek dengan kadar kolesterol total batas tinggi dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

1. Rerata usia subyek penelitian $35,57 \pm 5,20$ tahun, serta sebagian besar perempuan, mempunyai indeks aktivitas fisik dibawah nilai rata-rata dan indeks massa tubuh di atas nilai normal.
2. Persentase asupan energi dibandingkan dengan kebutuhan energi total pada kelompok perlakuan tergolong cukup sedangkan kelompok kontrol tergolong kurang. Asupan lemak total dan kolesterol kedua kelompok adalah tergolong cukup. Asupan serat meningkat pada periode perlakuan, tetapi masih tergolong

kurang. Asupan polifenol meningkat bermakna pada kelompok perlakuan yang disebabkan karena kandungan polifenol dalam jus anggur.

3. Terdapat peningkatan kadar NO serum sesudah perlakuan, yang cenderung lebih tinggi pada kelompok perlakuan.
4. Hipotesis penelitian ini ditolak karena tidak didapatkan perbedaan bermakna perubahan NO serum antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol sesudah perlakuan.

6.3. Saran

1. Perlu dilakukan penelitian dengan rancangan serupa namun menggunakan plasebo sebagai salah satu teknik ketersamaran suatu uji klinik.
2. Perlu dilakukan pengukuran kadar polifenol secara laboratorik untuk mengetahui kandungan polifenol dalam bahan makanan sumber.
3. Perlu dilakukan penelitian dengan rancangan serupa namun menggunakan metoda pengukuran aktivitas enzim eNOS.

SUMMARY, CONCLUSIONS, AND RECOMMENDATIONS

Summary

Endothelial dysfunction is characterized by reduced bioavailability and bioactivity of nitric oxide (NO) which disturbs endothelial homeostasis. This condition could be caused by pathological stresses such as the increase of blood cholesterol level.⁴³

The aim of the study is to investigate the effect of grape juice on NO serum level on subjects who had borderline cholesterol total serum. The study was a parallel randomized clinical trial, conducted to members of Polri and PNS including their spouse in Polri mess, Cipinang, and age between 25 to 44 years. The study was to compare between a group who received 300 gram of grape juice once a day for 14 days includes TLC counseling (P) and a group who only received TLC counseling (K).

The thirty five subjects were divided into two groups using simple randomization, but only 32 subjects were completed the study.

Interview was conducted to collect data of age, history of hypercholesterolemia in subject's family, physical activity, and body mass index. Intake of energy, total fat, cholesterol, fiber and polyphenol were get from food record analysis which were performed before intervention, first week and second week of the intervention. Laboratory finding of NO and total cholesterol serum level was done before and after treatment.

Data of subject characteristic, intakes, and laboratory before treatment were homogenous. The mean of subject age was 35.57 ± 5.20 years, and most of them (77.1%) were women. Physical activity index of the subjects were mostly (68.5%) under average. Sixty percent of subject's body mass indexes were above normal.

Energy and nutrition intakes on first and second week of the intervention period did not indicate significant difference. Comparison of the percentage of energy intake and total energy of the treatment group was sufficient, while it was low on control group. Total fat intake of both groups was in normal level (25 – 35% total calorie). Cholesterol intake of both groups was in normal level too (< 200 mg/day). Fiber intake increased on intervention period, but still under normal intake level.

Polyphenol intake showed a significant difference between two groups on the intervention period, which caused by polyphenol content of grape juice that was give to the treatment group.

Mean of body mass index of both groups after treatment was decrease, but it was not consider significant difference.

Nitric oxide serum level after intervention increased on both groups, and tends to be higher on the treatment group, even it was consider not significant. Total cholesterol serum of both groups after intervention decreased, even still on borderline level.

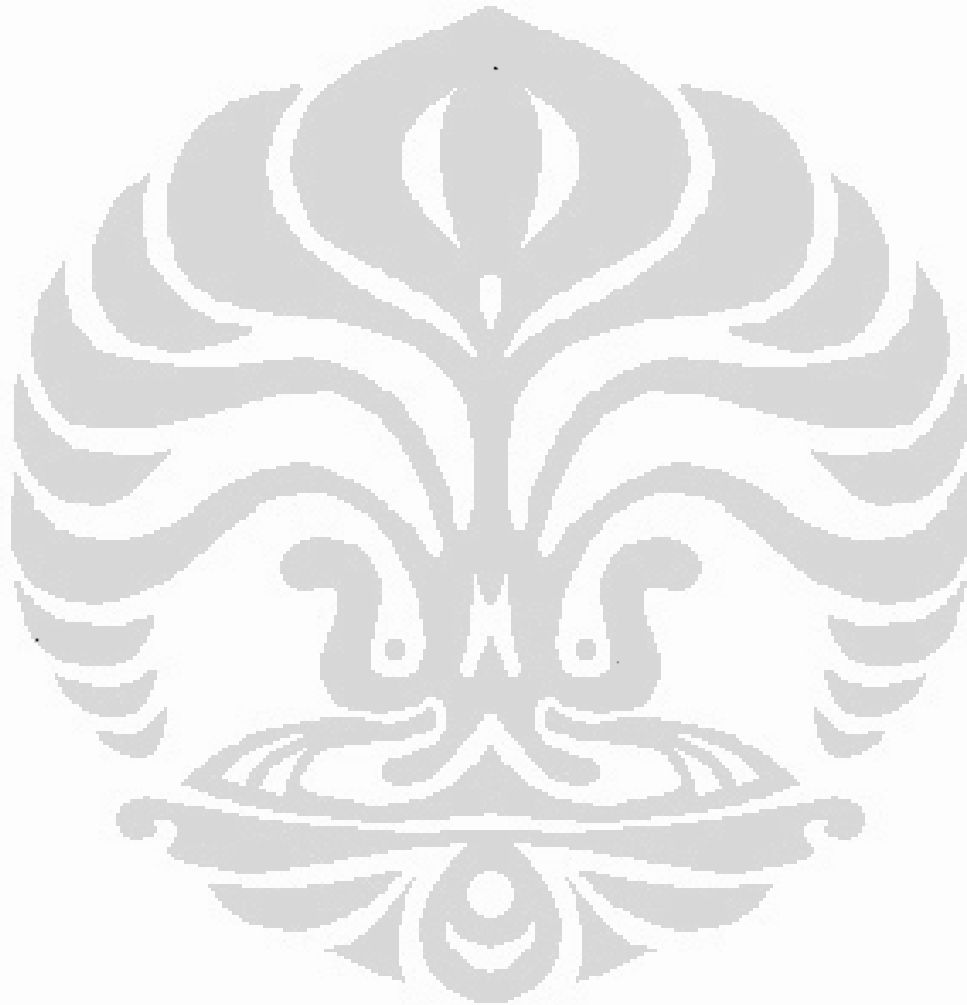
Conclusions

The effect of grape juice on NO serum level in the subjects with borderline total cholesterol level can be concluded as follow:

1. The mean of subject age was 35.57 ± 5.20 years, most of them were women, with physical activity index was under average value and body mass index was above normal value.
2. The comparison of percentage of energy intake and total energy on the treatment group was sufficient, whereas lower on control group. Total fat and cholesterol intake of both groups was sufficient. The fiber intake was increase on the intervention period, even it was considered low. Polyphenol intake was increase significantly on the treatment group which was caused by the intake of grape juice.
3. The NO serum level was increased after intervention, and tends to be higher on the treatment group.
4. Hypothesis of this study could not be proved because there was not significant different on serum total cholesterol level and serum NO level between both groups after interventiom.

Recommendations

1. There is a need to perform a study with similar design, but using placebo.
2. The polyphenol content of grape juice must be laboratorial measured.
3. There is a need to perform a study with similar design, but using marker of eNOS enzim activity.



DAFTAR REFERENSI

1. World Health Organization. Chronic Disease are The Major Caused of Death in almost All Countries. *Preventing Chronic Diseases A Vital Investment*,2005;1: 2-33.
2. Departemen Kesehatan RI. Situasi Derajat Kesehatan. *Profil Kesehatan Indonesia 2006*. Jakarta: Depkes, 2007.
3. Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Vita JA. The clinical implication of endothelial dysfunction. *J.Am.Coll.Cardiol.* 2003;42:1149-60.
4. Pradono G, Kusumawardani N, Lubis A, Hapsari D, Sulistyawati N, Kristanti CM. Status Kesehatan Masyarakat Indonesia. *Survei Kesehatan Rumah Tangga* . Litbangkes, 2004;2:1-93.
5. Klag MJ, Ford DE, Mead LA, He J, Whelton PK, Liang KY et al. Serum cholesterol in young men and subsequent cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1993;328:313-18.
6. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: Testing and clinical relevance. *Circulation* 2007;115:1285- 95.
7. Vita JA, Keaney JF. Endothelial function: A barometer for cardiovascular risk? *Circulation* 2002;106:640-642.
8. Desideri G, Contina M, Tomassoni G, Masci PG, Satucci A, Ferri C. Vitamin E supplementation reduces plasma vascular cell adhesion molecule-1 and von Willebrand factor levels and increases nitric oxide concentration in hypercholesterolemic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(6):2940-45.
9. Lefler AM, Ma XL. Decreased basal nitric oxide release in hypercholesterolemia increases neutrophil adherence to rabbit coronary artery endothelium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1993;13:771-6.
10. National Cholesterol Education Program (NCEP) Adult Intervention Panel III (ATP III). 2001. Expert panel on detection, evaluation, and intervention of high blood cholesterol in adult. <http://www.NCEP.com> (diakses tanggal 14 Maret 2009).
11. Lampe JW. Health effect of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *Am J Clin Nutr* 1999;70:475S-90S.

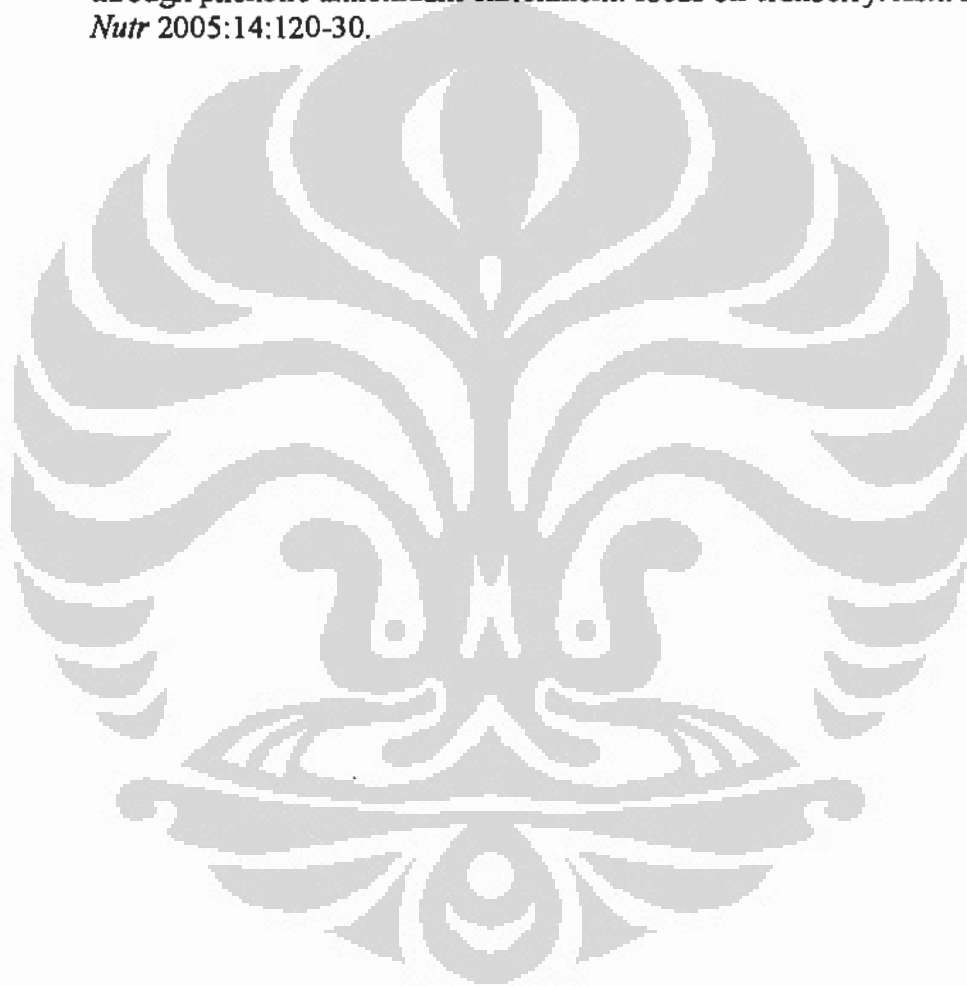
12. Croce G, Passacuale G, Necozone S, Ferri C, Desideri G. Nonpharmacological treatment of hypercholesterolemia increases circulating endothelial progenitor cell population in adults. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006;26:38-39.
13. Grebe M, Eisele HJ, Weissmann N, Schaefer M, Tillmanns H, Seeger W et al. Antioxidant vitamin C improves endothelial function in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit. Care Med* 2006;173:897-901.
14. Agli MD, Busciala A, Bosisio E. Vascular effect of wine polyphenols. *Cardiovascular Research* 2004;63:593-602.
15. Meral R. Antioxidant effect of wine polyphenols. *Trakia journal of Sciences* 2008;6:57-62.
16. Leikert JF, Rathel TR, Wohlfart P, Cheynier V, Vollmar A, Dirsch VM. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation* 2002;106:1614-17.
17. Anselm E, Chataigneau M, Ndiaye M, Chataigneau T, Kerth VB. Grape juice cause endothelium-dependent relaxation via redox-sensitive Src- and Akt-dependent activation of eNOS. *Cardiovascular Research* 2007;73:404-13.
18. Castilla P, Echarri R, Davalos A, Cerrato F, Ortega H, Teruel JL, et al. Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and anti-inflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects. *Am J Clin Nutr* 2006; 84:252-62.
19. Matsuo S, Nakamura Y, Takahashi M, Ouchi Y, Hosoda K, Nozawa M, et al. Effect of red wine and ethanol on production nitric oxide in healthy subjects. *The American Journal of Cardiology* 2001;87:1029-31.
20. Freedman JE, Parker C, Li L, Perlman JA, Frei B, Ivanov V et al. Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. *Circulation* 2001;103:2792-98.
21. Stein JH, Keevil JG, Wiebe DA, Aeschlimann S, Folts JD. Purple grape juice improves endothelial function and reduces the susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1999;100:1050-55.
22. Albers AR, Varghese S, Vitseva O, Vita JA, Freedman JE. *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004;24:179-180.

23. Manohara N. Pengaruh pemberian jus anggur terhadap kadar kolesterol LDL subyek dengan kadar kolesterol total batas tinggi tahun 2009. Tesis Magister Sains ; Ilmu Gizi Klinik. Jakarta:FKUI
24. Balai Penelitian Tanah. Iklim dan tanah untuk pengembangan anggur. *Warta Penelitian & Pengembangan Pertanian* 2008;30(6):14-6
25. Kennedy J. Grape and wine phenolics: Observations and recent findings. *Cien. Inv. Agr.* 2008;35(2):107-20.
26. Brat P, George S, Bellamy A, Chaffaut LD, Scalbert A, Mennen L, et al. Daily polyphenol intake in France from fruit and vegetables. *J Nutr* 2006; 136: 2368-73.
27. Sakkiadi V, Georgiou C, Haroutounian S. A standard addition method to assay the concentration of biologically interesting polyphenols in grape berries by reversed-phase HPLC. *Molecules* 2007;12:2259-69.
28. Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 2000;130:2073S-85S.
29. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004;79:727- 47.
30. Cheynier V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am J Clin Nutr* 2005;81:223S-9S.
31. Iacopini P, Baldi M, Storchi P, Sebastiani L. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition and Analysis* 2008;21:589-98.
32. Williamson G, Manach C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 97 intervention studies. *Am J Clin Nutr* 2005;81:243S-55S.
33. Kroon PA, Clifford MN, Crozier A. How should we assess the effect of exposure to dietary polyphenols in vitro? *Am J Clin Nutr* 2004;80:15-21.
34. Mennen L, Walker R, Pelissero CB, Scalbert A. Risks and safety of polyphenol consumption. *Am J Clin Nutr* 2005;81:326S-9S.
35. Lambert JD, Shang S, Yang CS. Possible controversy over dietary polyphenols: Benefits vs risk. *Chem Res Toxicol* 2007;20:583-5.

36. Texas A and M University. How to judge grape ripeness before harvest. *Southwest regional vine and wine conference*. 2004. <http://winegrapes.tamu.edu/grow/ripening> (diakses 10 Juni 2009)
37. Tapas AR, Sakarkar DM, Kakde RB. Flavonoids as nutraceuticals: A review. *Trop J Pharm Res* 2008;7(3):1089-99.
38. Micallef M, Lexis L, Lewandowski P. Red wine consumption increases antioxidant status and decreases oxidative stress in the circulation of both young and old humans. *Nutrition Journal* 2007;6:27.
39. Stangl V, Dreger H, Stangl K, Lorenz M. Molecular targets of polyphenols in the cardiovascular system. *Cardiovascular Research* 2007;72:348-58.
40. PERKENI. Penatalaksanaan Dislipidemia. *Buku Petunjuk Praktis Penatalaksanaan Dislipidemia*. Perkumpulan Endokrinologi Indonesia 2005; Jakarta:h.5-14.
41. Krummel DA. Medical nutrition therapy for cardiovascular disease In: Mahan LK, Escott-Stump S, eds. *Krause' food and nutrition therapy*. 12th edition. Missouri: Saunder Elsevier, 2008.pp.833-61.
42. Carroll MD, et al. Trends in serum lipids and lipoproteins of adults, 1960-2002. *JAMA* 2005;294:1773
43. Melo LG, Gneccchi M, Pachori A. Endothelium-targeted gene and cell based therapies for cardiovascular disease. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1761-74.
44. Yasa M, Turkseven S. Vasoprotective effects of nitric oxide in atherosclerosis. *J. Pharm. Sci.* 2005;30:41-53.
45. Vallance P, Collier J. Fortnightly review biology and clinical relevance of nitric oxide. *BMJ* 1994;309:453-57.
46. Roosevelt FD. The Chemistry of Free Radicals and Related Reactive Species. In: Halliwell B, Gutteridge JMC, editors. *Free Radicals In Biology and Medicine*. 4th edition. New York: Oxford University Press. 2007.p.30-78.
47. Fleming I, Busse R. Molecular mechanism involved in the regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;284:R1-12.
48. Suvorava T, Lauer N, Kodja E. Physical inactivity causes endothelial dysfunction in healthy young mice. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:1320-7.

49. Celermajer D, Adams M, Clarkson P, Robinson J, McCredie R, Donald A, et al. Smoking and impaired endothelium dependent arterial dilatation in healthy young adults. *Journal of Medicine* 1996;334:150-5.
50. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular disease: The role of oxidant stress. *Circ Res* 2000;87:840-4.
51. Jungersten L, Ambring A, Wall B, Wennmalm K. Both physical fitness and acute exercise regulate nitric oxide formation in healthy humans. *J Appl Physiol* 1997;82:760-4.
52. Madiyono B, Moeslichan S, Sastroasmoro S, Budiman I, Purwanto HS. Perkiraan Besar Sampel. Dalam: Sastroasmoro S, Ismael S, editor. *Dasar-Dasar Metodologi Penelitian Klinis*, Edisi ke-2. Jakarta: Sagung Seto:h.269.
53. Gibson RS. *Principles of Nutritional Assessment*. 2nd edition. New York: Oxford University Press. 2005.p.273-93.
54. WHO-WPRO. The Asia-Pacific Perspective: Redefining Obesity and Its Treatment. *Health Communications Australia*. Pte Limited;2000:p.22. <http://www.diabetes.com> (diakses tanggal 14 Maret 2009).
55. Mantoye HJ, Kemper HCG, Saris WHM, Washburn RA. Measuring Physical Activity and Energy Expenditure. *Human Kinetics*. 1996.
56. Widyakarya Nasional Pangan dan Gizi 2004. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. *Angka Kecukupan Gizi Indonesia 2004*.
57. Lin C, Lai S, Liu S. Prevalence of hypercholesterolemia and its related factors in middle aged taiwanese adults. *Mid Taiwan J Med* 2003;8:85-90.
58. Lenton K, Cantin A, Fullop T, Payette H. Direct correlation of glutathion and ascorbate and their dependence on age and season in human lymphocytes. *Am J Clin Nutr* 2000;71:1194-200.
59. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Salvetti G, Bernini A, Salvetti S. Age-related reduction of NO availability and oxidative stress in human. *Hypertension* 2001;38:274-9.
60. Williams P, Hoffman K, La S. Weight related increases in hypertension, hypercholesterolemia, diabetes risk in normal weight male and female runners. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1811-9.

61. Benjamin E, Larson M, Keyes M, Mitchell G, Vasan R, Keaney J, et al. Clinical correlates and heritability of flow mediated dilation in the community: The Framingham Heart Study. *Circulation* 2004;109:613-9.
62. Higashi Y, Sasaki S, Kimura M, Nakagawa K, Noma K, Hara K, et al. Low body mass index is a risk factor for Impaired endothelial-dependent vasodilatation in human: Role of nitric oxide and oxidative stress. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:256-63.
63. Vatter D, Gaedhian R, Shetty K. Enhancing health benefits of berries through phenolic antioxidant enrichment: focus on cranberry. *Asia Pac J Clin Nutr* 2005;14:120-30.



MANUSCRIPT

EFFECT OF GRAPE JUICE CONSUMPTION FOR TWO WEEKS ON
SERUM NO LEVEL IN SUBJECTS WITH BORDERLINE HIGH SERUM
TOTAL CHOLESTEROL LEVEL

Maria D, Permadhi I, Mudjihartini N

ABSTRACT

Objective. To investigate the effects of 300 gram per day grape juice during two weeks on serum NO level in male and female subjects with borderline high total cholesterol level.

Methods. The study was a field trial. Thirty five subjects were selected using certain criteria and randomly (simple randomization) divided into two groups. The treatment group (n=18) received grape juice and nutrition counseling; the control group (n=17) received nutrition counseling. Data obtained directly from the subjects were age, gender, history of hypercholesterolemia in subject's family, physical activity, and body mass index, intake of energy, fat, cholesterol, fiber and polyphenol using food record. Laboratory findings of serum NO level and total cholesterol level were done before and after intervention. For statistical analysis, unpaired t-test and Mann Whitney were used with the level of significance was 5%. Eighteen subjects in the treatment group and fourteen subjects in the control group completed the study and analyzed. Mean of age were 35.57 ± 5.20 years old. The physical activity index of both groups were low. The characteristics of the two groups were closely matched at base line ($p > 0.05$). After two weeks intervention, subjects' energy consumed in the treatment group achieved the recommended diet, while in the control group was below. The average intake of total fat and cholesterol in both groups achieved the recommended diet, but the fiber intake were below. The average intake of polyphenol in the treatment group was increased significantly than the control group ($p < 0.05$). There were increased of serum NO level after treatment in both groups, but not statistically significant ($p > 0.05$). There were decreased on serum total cholesterol level in both groups, although not statistically significant ($p > 0.05$).

Conclusions. The effect of grape juice for two weeks did not significantly increase serum NO level in the treatment group.

Keywords:

Grape juice, polyphenol, serum NO level, serum total cholesterol

INTRODUCTION

Cardiovascular disease (CVD) is a global epidemic disease. It is also happened in Indonesia as reported in *Profil Kesehatan Indonesia 2006*.^{1,2}

High cholesterol level is one of risk factors of CVD.³ Based on *Survey Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) 2004*, the prevalence of people with borderline high cholesterol level (200–239 mg/dL) on the age of 25–34 years old was 9.3%, 35–44 years old was 10.8%, then increase as older age to reach the highest level at 15.5%

on 55-64 years old.⁴ Klag et al⁵ found that serum total cholesterol level could be a predictor of CVD insidens.

Genetic, age, gender, obesity, and food intake were factors which could increase blood cholesterol level, through the increase of reactive oxygen species (ROS), and then decrease of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activity and nitric oxide (NO) bioavailability.⁶ The decrease of NO bioavailability causes endothelial dysfunction³ and then atherogenesis and atherosclerosis which is the main pathogenesis of CVD. Other factors of endothelial dysfunction are hypertension, hyperglycemia, chronic disease, smoking and low physical activity.^{3,6,7}

Endothelial dysfunction is reversible, so CVD could be decreased by improve the endothelial function.³ The increased of NO bioavailability can be a indicator of endothelium function improvement.^{8,9} National Cholesterol Education Program (NCEP) Adult Treatment Panel (ATP) III 2002¹⁰ recommended therapeutic life style changes (TLC) to reduce CVD risk factor for individual with borderline high cholesterol level. TLC is a guide to maintain normal body weight, physical activity, goog dietary pattern.^{3,10,11} Studies proved that diet counseling, physical activity¹² and antioxidant intake,^{8,13} improve NO bioavailability.

Polyphenol in grape was known as antioxidant^{8,16} that could improve endothelium function^{14,15} through increased eNOS activity¹⁷ and NO bioavailability.

Castilla et al¹⁸ showed that grape juice intake for two weeks could corrected endothelial function of the subjects. Matsuo et al¹⁹ showed a significant increase of serum NO level on subjects, 30 minutes after red wine intake. Freedman et al²⁰ found that drinking grape juice 7 mL/kg body-weight/day for two weeks could increase NO level on healthy subjects. The similar result was got with Stein et al²¹, that gave 8 mL of grape juice/kg body-weight/day on dislipidemia subjects. But Albers et al²² did not show the same result.

The study was a field trial, compared two groups, where the treatment group received grape juice (that made from 300 grams grapes per day) for 14 days and nutrition counseling (P) and control group received nutrition counseling only (K). Subject were members of Polri and PNS including their spouse, that live in Polri Mess Cipinang, who had borderline high serum total cholesterol level.

METHODS

Subjects

The subjects of this study consists of 27 women and 8 men, age between 25-44 years old and were divided into two groups using simple randomization, 18 subjects were in the treatment group and 17 subjects were in the control group. The study was a field trial. One hundred twenty eight members of Polri, PNS and their spouse were participated on laboratory test to select subjects with total cholesterol level 200-239 mg/dL. Exclusion criteria were smoking, hypertension, diabetes mellitus and other chronic disease. After two weeks of intervention, eighteen subjects in the treatment group and fourteen subjects in control group were completed the study. This study was approved by the ethics committee Medicine Faculty of Indonesia University.

Study Measurements

Selected subjects completed a questionnaire of demographic information. Physical activity was ascertained with the use of three questions questionnaire. These questions were aimed to quantify the frequency, duration and intensity level of physical activity. Body weight and height were measured to determine the body mass index (BMI). The subjects completed 2 x 24 hours food record to determine energy, total fat, cholesterol, fiber, and polyphenol intake.

Subjects were asked to fast 10-12 hours (overnight fast) before blood were drawn. Five mL fasting blood was used to measure total cholesterol, glucose fasting, ureum, creatinine, SGOT, and SGPT during subject selection and another 1 mL each was used to measure serum NO level before treatment and total cholesterol level and serum NO level after treatment.

Statistical Analysis

All statistical calculation was performed with Statistical Package for Social Science (SPSS version 11.5) software. The normality test was assessed by Shapiro Wilk test. Differences in mean values were assessed by unpaired t-test for the normal distributed data or Mann Whitney for the abnormal one. Values of $p < 0.05$ were considered to indicate statistical significance.

RESULTS

Table 1. Characteristic of Base Line

Variable	Treatment (n=18)	Control (n=17)	p
Sex n (%)			
Male	4 (22,2%)	4 (23,5%)	0,85 ^c
Female	14 (77,8%)	13 (76,5%)	
History of hypercholesterolemia in family n (%)			
Yes	8 (44,4%)	7 (41,2%)	0,63 ^c
No	10 (55,6%)	10 (58,8%)	
Age (years)	35,50 ± 5,35	36,65 ± 5,30	0,96 ^t
25 - 34	8 (44,4%)	7 (41,2%)	
35 - 44	10 (55,6%)	10 (58,8%)	
Physical Activity	36,00 (24,00-60,00)	27,00 (16,00-39,00)	0,11 ^m
Low	3 (16,7%)	8 (47,1%)	
Sufficient	8 (44,4%)	5 (29,4%)	
Average	5 (27,8%)	2 (11,8%)	
Good	1 (5,6%)	1 (5,9%)	
Very good	1 (5,6%)	1 (5,9%)	

c = chi-square test; t = unpaired t-test; m = mann-whitney test

The number of female subjects was larger than males and the physical activity index of both groups were categorized sufficient. Mean age of subjects was 35.57±5.20 years old, and there were not significant different between treatment and control group.

Table 2. BMI Before and After Treatment

Variable	Treatment	Control	p
BMI			
H0	24,61±2,58	23,47±4,09	0,34 ^t
- 18,5-22,9 n(%)	5 (27,8)	8 (47,1)	
- 23-24,9 n(%)	5 (27,8)	3 (17,6)	
- 25-29,9 n(%)	8 (44,4)	6 (35,3)	
H15	24,48±2,59	23,39±4,02	0,36 ^t
- 18,5-22,9 n(%)	4 (22,2)	8 (57,1)	
- 23-24,9 n(%)	7 (38,8)	0	
- 25,29,9 n(%)	7 (38,8)	6 (42,9)	

t = unpaired t-test

The BMI of treatment group and control group were not significantly different.

Table 3. Energy, Total Fat, Cholesterol, Fiber, and Polyphenol Intake

Variabel	Perlakuan	Kontrol	p
Energi (kkal) {% asupan energi}			
H0	1144,90(782,31-1395,28) {66,54(55,05-94,41)}	1009,35(765,43-1318,14) {62,40(53,31-81,98)}	0,79 ^m 0,72 ^m
H8	1424,05(1069,18-1864,25) {92,21±26,73}	1296,03(1039,42-1564,41) {85,40(69,50-98,18)}	0,47 ^m 0,51 ^m
H15	1456,85±378,38 {90,36±26,73}	1128,75(979,03-1693,58) {73,52(61,56-103,97)}	0,12 ^m 0,09 ^m
Lemak (g) {% asupan lemak}			
H0	52,25(30,96-62,51) {29,67(20,25-37,00)}	39,15(31,00-52,66) {21,95(18,71-32,75)}	0,41 ^m 0,49 ^m
H8	52,10(38,89-75,69) {32,00(20,79-44,15)}	49,98(42,35-63,28) {29,99(25,66-36,59)}	0,82 ^m 0,90 ^m
H15	57,80(50,13-76,49) {36,27(26,47-40,89)}	45,23(34,91-73,56) {27,74(20,73-40,89)}	0,31 ^m 0,11 ^m
Kolesterol (mg)			
H0	130,70(78,78-176,78)	123,05(97,13-167,70)	0,79 ^m
H8	191,15(150,73-248,35)	146,60(115,65-212,05)	0,19 ^m
H15	179,10 (154,70-213,53)	124,85 (86,69-265,25)	0,03 ^{*m}
Serat (g)			
H0	5,48(4,49-8,19)	7,05(5,20-8,40)	0,31 ^m
H8	9,25(7,39-13,05)	7,45 (6,48-8,78)	0,06 ^m
H15	7,45 (6,48-8,78)	6,28 (3,48-7,70)	0,06 ^m
Polifenol (mg)			
H0	71,09 (20,49-106,54)	45,90 (34,83-67,01)	0,87 ^m
H8	620,50 (593,55-690,88)	48,28 (18,16-87,11)	0,00 ^{*m}
H15	623,68 (608,09-714,85)	63,12 (18,06-100,31)	0,00 ^{*m}

* = significant; m = mann-whitney test

The energy, total fat and fiber intake of treatment group and control group were not significantly different, either before or after treatment. Cholesterol intake

were significant different in second week of treatment. The polyphenol intake of both groups before treatment was not significantly different, and during treatment there was increased of polyphenol intake on treatment group, and both groups showed significantly different.

Table 4. Serum NO Level Before and After Treatment

Variabel	Perlakuan	Kontrol	p
NO serum ($\mu\text{mol/L}$)			
H0	8,37(5,66-13,28)	8,28(7,38-10,73)	0,92 ^m
			0,11 ^w
H15	11,76(7,74-13,39)	9,57(7,71-11,86)	0,18 ^w
			0,30 ^m

m = mann-whitney test; w = wilcoxon test

The serum NO level of both groups increased after treatment, even higher in treatment group, but not significantly different either between or within group

Table 5. Serum Total Cholesterol Before and After Treatment

Variable	Treatment	Control	p
Serum Total Cholesterol (mg/dL)			
H0	224 (208,25-229,25)	212 (206,00-227,50)	0,09 ^m
H15	208,56 \pm 16,55	206,00 \pm 16,23	0,67 ^t

t = unpaired t-test; m = mann-whitney test

Total cholesterol level between treatment group before ($p=0.09$) and after ($p=0.67$) treatment was not significantly different. The mean of serum total cholesterol level in both groups after treatment was still on borderline category.

DISCUSSION

The study was comparing the treatment group which received 300 gram of grape juice per day for 14 days and TLC counseling and the control group which only received TLC counseling.

The limitations of this study were the absent of placebo for control group, the calculation of polyphenols content in grape juice was not based laboratorial measurement, but just based on table of polyphenols food source.²⁴ The dietary survey in this study based on food record that have several limitations.²⁵ The limitation on determining nutrient intake using nutrisurvey 2007 program, due to difficulty in finding the local food in the program. Therefore analysis was done by self-estimate of foodstuff portion. Laboratory findings using colorimetric Griess to determine nitrate and nitrite content as NO metabolite, because NO was gas form and had short half life time.

The age of the subjects was 25-44 years old. This criteria was determined base on the intention of increasing total cholesterol level on the age range, and related to increasing risk level of CVD.^{5,10,25} The older of age, the antioxidant level would

decrease and free radical increase.^{26,27} The unbalance of antioxidant and free radical would cause oxidative stress, and then decrease NO bioavailability that would cause endothelial dysfunction and atherosclerosis.^{3,27}

Confounding variables in this study included age, sex, BMI, smoking, nutrient intake, physical activity were control by restriction using exclusion criteria, so the results were not bias. The characteristic data of both groups at base line were not significantly deferent, because it was closely matched at base line.

The subjects of study was 77.1% female, therefore in several studies,^{10,18,20} there was no different response between male and female in therapy of decreasing total cholesterol level. A simple randomized was used to equally distribute female in treatment and control groups.

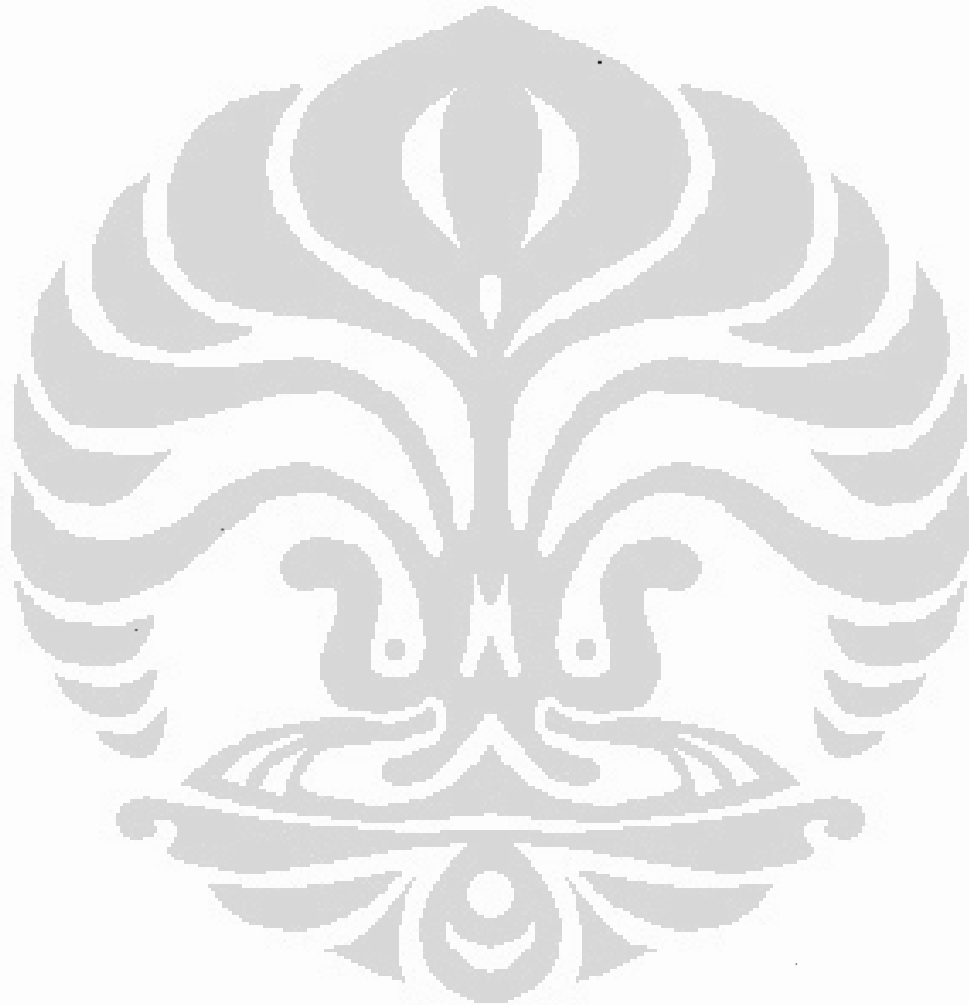
Physical activity index was below average because most subjects were house wife with no routine sport practice. Low physical activity could cause decrease of NO bioavailability due to decrease of enzyme eNOS expression,²⁸ and could cause endothelial disfunction, and then atherosclerosis and CVD.³

After treatment, 10 (55.6%) subjects in treatment group and 11 (78.6%) subjects in control group were decrease their BMI. This was due to effective application of TLC counseling.

Percentage of energy intake to TEE was sufficient in treatment group, but lower in control group. Energy intake and body weight have positive correlation. The average of fat intake of subjects in both groups were in normal range, 25-35% of total calory.¹⁰ Cholesterol intake of subjects in both groups were in the advised range (< 200 mg/day). Intake of fiber in both groups were low than advised intake at 20-30 gram/day,¹⁰ and not significantly different, even though the treatment group consumed 300 gram/day grape juice. But this affected to the polyphenol intake in treatment group was higher than control group during treatment period and significantly different.

The serum NO level in both group was increase after treatment and even higher in treatment group, but the different was not statistically significant. This result was different from pre-post test study design by Freedman et al²⁰ and Stein et al²¹ which intervene subjects with grape juice for 14 days and resulted significantly increase of serum NO level. The different result could be caused by determination of polyphenol content of grape juice was not based on laboratorial measurement, but used table of polyphenols content in food sources.²⁹ Meanwhile, the polyphenol content in grape fruit was vary from 36 mg/100 gram to 275.5 mg/100 gram grape fruit.²⁹ Then, there was possibility that the actual polyphenol containing in the grape juice was not as much as the calculation. Other factors could affect the polyphenol content were transportation, storage condition and process of juice making, which decreased polyphenols content of grapes. After 14 days of intervention, serum total cholesterol in both groups was decrease, but not significantly different between treatment and control group. The decreased of total cholesterol level that happened in both group maybe caused by the decreased of IMT because of corrected dietary patern of the subjects after received TLC counseling. For treatment group, there was a possibility this result because of the effect of grape juice, that similar with the result

of Castilla et al¹⁸, which found the decrease of total cholesterol level in treatment group after drinking purple grape juice for two weeks.



REFERENCES

1. World Health Organization. Chronic Disease are The Major Caused of Death in almost All Countries. *Preventing Chronic Diseases A Vital Investment*, 2005;1: 2-33.
2. Departemen Kesehatan RI. Situasi Derajat Kesehatan. *Profil Kesehatan Indonesia 2006*. Jakarta: Depkes, 2007.
3. Widlansky ME, Gokce N, Keany JF, Vita JA. The clinical implication of endothelial dysfunction. *J.Am.Coll.Cardiol.* 2003;42:1149-60.
4. Pradono G, Kusumawardani N, Lubis A, Hapsari D, Sulistyawati N, Kristanti CM. Status Kesehatan Masyarakat Indonesia. *Survei Kesehatan Rumah Tangga* . Litbangkes, 2004;2:1-93.
5. Klag MJ, Ford DE, Mead LA, He J, Whelton PK, Liang KY et al. Serum cholesterol in young men and subsequent cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1993;328:313-18.
6. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: Testing and clinical relevance. *Circulation* 2007;115:1285- 95.
7. Vita JA, Keaney JF. Endothelial function: A barometer for cardiovascular risk? *Circulation* 2002;106:640-642.
8. Desideri G, Contina M, Tomassoni G, Masci PG, Satucci A, Ferri C. Vitamin E supplementation reduces plasma vascular cell adhesion molecule-1 and von Willebrand factor levels and increases nitric oxide concentration in hypercholesterolemic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(6):2940-45.
9. Lefer AM, Ma XL. Decreased basal nitric oxide release in hypercholesterolemia increases neutrophil adherence to rabbit coronary artery endothelium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1993;13:771-6.
10. National Cholesterol Education Program (NCEP) Adult Intervention Panel III (ATP III). 2001. Expert panel on detection, evaluation, and intervention of high blood cholesterol in adult. <http://www.NCEP.com> (diakses tanggal 14 Maret 2009).
11. Lampe JW. Health effect of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *Am J Clin Nutr* 1999;70:475S-90S.
12. Croce G, Passacuale G, Necozone S, Ferri C, Desideri G. Nonpharmacological treatment of hypercholesterolemia increases circulating endothelial progenitor cell population in adults. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006;26:38-39.
13. Grebe M, Eisele HJ, Weissmann N, Schaefer M, Tillmanns H, Seeger W et al. Antioxidant vitamin C improves endothelial function in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit. Care. Med* 2006;173:897-901.
14. Agli MD, Busciala A, Bosisio E. Vascular effect of wine polyphenols. *Cardiovascular Research* 2004;63:593-602.
15. Meral R. Antioxidant effect of wine polyphenols. *Trakia journal of Sciences* 2008;6:57-62.
16. Leikert JF, Rathel TR, Wohlfart P, Cheynier V, Vollmar A, Dirsch VM. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation* 2002;106:1614-17.

17. Anselm E, Chataigneau M, Ndiaye M, Chataigneau T, Kerth VB. Grape juice cause endothelium-dependent relaxation via redox-sensitive Scr- and Akt-dependent activation of eNOS. *Cardiovascular Research* 2007;73:404-13.
18. Castilla P, Echarri R, Davalos A, Cerrato F, Ortega H, Teruel JL, et al. Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and anti-inflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects. *Am J Clin Nutr* 2006; 84:252-62.
19. Matsuo S, Nakamura Y, Takahashi M, Ouchi Y, Hosoda K, Nozawa M, et al. Effect of red wine and ethanol on production nitric oxide in healthy sybjects. *The American Journal of Cardiology* 2001;87:1029-31.
20. Freedman JE, Parker C, Li L, Perlman JA, Frei B, Ivanov V et al. Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. *Circulation* 2001;103:2792-98.
21. Stein JH, Keevil JG, Wiebe DA, Aeschlimann S, Folts JD. Purple grape juice improves endothelial function and reduces the susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1999;100:1050-55.
22. Albers AR, Varghese S, Vitseva O, Vita JA, Freedman JE. *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004;24:179-180.
23. Brat P, George S, Bellamy A, Chaffaut LD, Scalbert A, Mennen L, et al. Daily polyphenol intake in France from fruit and vegetables. *J Nutr* 2006; 136: 2368-73.
24. Gibson RS. *Principles of Nutritional Assessment*. 2nd edition. New York: Oxford University Press. 2005.p.273-93.
25. Lin C, Lai S, Liu S. Prevalence of hypercholesterolemia and its related factors in middle aged taiwanese adults. *Mid Taiwan J Med* 2003;8:85-90.
26. Lenton K, Cantin A, Fullop T, Payette H. Direct correlation of glutathion and ascorbate and their dependence on age and season in human lymphocytes. *Am J Clin Nutr* 2000;71:1194-200.
27. Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, Salvetti G, Bernini A, Salvetti S. Age-related reduction of NO availability and oxidative stress in human. *Hypertension* 2001;38:274-9.
28. Suvorava T, Lauer N, Kodja E. Physical inactivity causes endothelial dysfunction in healthy young mice. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:1320-7.
29. Brat P, George S, Bellamy A, Chaffaut LD, Scalbert A, Mennen L, et al. Daily polyphenol intake in France from fruit and vegetables. *J Nutr* 2006; 136: 2368-73.



UNIVERSITAS INDONESIA

FAKULTAS KEDOKTERAN

Jalan Salemba Raya No. 6 Jakarta Pusat

Pos Box 1358 Jakarta 10430

Kampus Salemba Telp. 31930371, 31930373, 3922977, 3927360, 3912477, 3153236, Fax. : 31930372, 3157288, e-mail : office@fk.u

Nomor : 278 /PT02.FK./43/N/2009
 Lampiran :
 Perihal : Permohonan persetujuan atas perubahan/penambahan
 Atas protokol penelitian yang telah lolos kaji etik

15 Juni 2009

Kepada yth.
 Dr. Niken Manohara
 Departemen Ilmu Gizi
 FKUI/RSCM
 Jakarta.

Dengan hormat,

Sehubungan dengan penelitian yang berjudul: "Efek pemberian jus anggur terhadap perubahan kadar kolesterol LDL subyek dengan kadar kolesterol total batas tinggi" . Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran UI telah menerima surat Saudara bertanggal 8 Juni 2009 perihal perubahan berikut:

- Penambahan nama peneliti dr.Dyah Maria Wahyuningtyas
- Penambahan pemeriksaan nitric oxide (NO).

Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dapat menyetujui perubahan tersebut.



Komisi Etik Penelitian

Prof. Dr. Agus Firmansyah, SpA(K)

Universitas Indonesia

Lampiran 2
Formulir A1

Lembar Informasi Penelitian
(Untuk kelompok perlakuan)

Yth. Saudara/Saudari;

Dengan ini kami jelaskan bahwa dengan gaya hidup dan pola makan yang salah dapat menyebabkan kadar kolesterol di dalam darah meningkat, sehingga dapat memicu timbulnya penyakit kardiovaskuler (PKV) seperti penyakit jantung dan stroke di kemudian hari. Berdasarkan data-data yang kami dapatkan, jumlah kematian penduduk usia produktif akibat penyakit kardiovaskuler PKV makin meningkat.

Untuk itu kami akan mengadakan penelitian pada laki-laki dan perempuan berusia 25-44 tahun, mengenai pencegahan PKV. Apabila Saudara/Saudari bersedia mengikuti penelitian ini, maka akan dilakukan:

1. Pengambilan darah sebanyak 5 cc atau satu sendok makan saat sebelum berlangsungnya penelitian, serta 1 cc pada saat awal, dan akhir penelitian, yang didahului dengan puasa selama 10-12 jam.
2. Pengukuran tekanan darah dan tinggi badan saat sebelum penelitian, serta berat badan pada sebelum dan sesudah penelitian.
3. Diberi lembar catatan asupan makanan, untuk mencatat semua makanan dan minuman yang dikonsumsi dalam 24 jam, yang dilakukan dua kali seminggu, pada sebelum penelitian serta minggu pertama dan ke dua penelitian
4. Diberi minum 1 (satu) gelas jus anggur setiap hari selama 14 hari berturut-turut dan mengikuti penyuluhan tentang gizi yang diadakan sebelum periode minum jus anggur serta hari ke-1, dan ke-8 pada periode minum jus anggur.

Akibat pengambilan darah, mungkin Saudara/Saudari akan merasakan sedikit ketidaknyamanan, namun hal ini dapat diatasi dengan pengambilan darah yang dilakukan oleh tenaga yang sudah ahli dan terlatih.

Keikutsertaan Saudara/Saudari dalam penelitian ini bersifat sukarela dan Ibu/Saudari dapat menolak atau mengundurkan diri selama proses penelitian berlangsung. Keuntungan bagi Saudara/Saudari apabila ikut serta dalam penelitian ini adalah dapat mengetahui keadaan kesehatan dan gizi Saudara/Saudari. Penelitian ini juga diharapkan dapat meningkatkan status kesehatan dan gizi Saudara/Saudari. Semua data pada penelitian ini bersifat rahasia.

Apabila Saudara/Saudari bersedia ikut dalam penelitian ini, maka kami akan memohon kesediaannya untuk dapat menandatangani surat persetujuan bahwa Saudara/Saudari menjadi peserta penelitian:

PENGARUH PEMBERIAN JUS ANGGUR TERHADAP KADAR *NITRIC OXIDE* SERUM PADA SUBYEK DENGAN KADAR KOLESTEROL BATAS TINGGI

Hal-hal yang belum jelas dalam penelitian ini dapat ditanyakan secara langsung atau melalui telepon pada penanggung jawab penelitian ini, yaitu dr. Dyah Maria Wahyuningtyas (0811264971).

Atas kesediaan Ibu/Saudari, kami ucapkan terima kasih.

Universitas Indonesia

Formulir A2

Lembar Informasi Penelitian
(Untuk kelompok kontrol)

Yth. Saudara/Saudari;

Dengan ini kami jelaskan bahwa dengan gaya hidup dan pola makan yang salah dapat menyebabkan kadar kolesterol di dalam darah meningkat, sehingga dapat memicu timbulnya penyakit kardiovaskuler (PKV) seperti penyakit jantung dan stroke di kemudian hari. Berdasarkan data-data yang kami dapatkan, jumlah kematian penduduk usia produktif akibat penyakit kardiovaskuler PKV makin meningkat.

Untuk itu kami akan mengadakan penelitian pada laki-laki dan perempuan berusia 25-44 tahun, mengenai pencegahan PKV. Apabila Saudara/Saudari bersedia mengikuti penelitian ini, maka akan dilakukan:

1. Pengambilan darah sebanyak 5 cc atau satu sendok makan saat sebelum berlangsungnya penelitian, serta 1 cc pada saat awal, dan akhir penelitian, yang didahului dengan puasa selama 10-12 jam.
2. Pengukuran tekanan darah dan tinggi badan saat sebelum penelitian, serta berat badan pada sebelum dan sesudah penelitian.
3. Diberi lembar catatan asupan makanan, untuk mencatat semua makanan dan minuman yang dikonsumsi dalam 24 jam, yang dilakukan dua kali seminggu, pada sebelum penelitian serta minggu pertama dan ke dua penelitian.
4. Mengikuti penyuluhan tentang gizi yang diadakan sebelum penelitian, serta awal minggu pertama dan ke dua penelitian.

Akibat pengambilan darah, mungkin Saudara/Saudari akan merasakan sedikit ketidaknyamanan, namun hal ini dapat diatasi dengan pengambilan darah yang dilakukan oleh tenaga yang sudah ahli dan terlatih.

Keikutsertaan Saudara/Saudari dalam penelitian ini bersifat sukarela dan Ibu/Saudari dapat menolak atau mengundurkan diri selama proses penelitian berlangsung. Keuntungan bagi Saudara/Saudari apabila ikut serta dalam penelitian ini adalah dapat mengetahui keadaan kesehatan dan gizi Saudara/Saudari. Penelitian ini juga diharapkan dapat meningkatkan status kesehatan dan gizi Saudara/Saudari. Semua data pada penelitian ini bersifat rahasia.

Apabila Saudara/Saudari bersedia ikut dalam penelitian ini, maka kami akan memohon kesediaannya untuk dapat menandatangani surat persetujuan bahwa Saudara/Saudari menjadi peserta penelitian.

PENGARUH PEMBERIAN JUS ANGGUR TERHADAP KADAR *NITRIC OXIDE* SERUM PADA SUBYEK DENGAN KADAR KOLESTEROL BATAS TINGGI

Hal-hal yang belum jelas dalam penelitian ini dapat ditanyakan secara langsung atau melalui telepon pada penanggung jawab penelitian ini, yaitu dr. Dyah Maria Wahyuningtyas (0811264971).

Atas kesediaan Ibu/Saudari, kami ucapkan terima kasih.

Universitas Indonesia

Formulir A3

Lembar Persetujuan**Pengaruh Pemberian Jus Anggur terhadap Kadar *Nitric Oxide* Serum pada Subyek dengan Kadar Kolesterol Batas Tinggi**

Peneliti:

Dyah Maria Wahyuningtyas

Departemen Ilmu Gizi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

Jl. Salemba Raya 6, Jakarta. Tel. (021)31930208

Setelah mendengar dan membaca penjelasan mengenai tujuan dan manfaat dari penelitian di atas, maka yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama :
 Unsur :
 Alamat :

Menyatakan bahwa saya

- Bersedia untuk mengikuti penelitian ini selama 2 (dua) minggu
- Bersedia mencatat makanan dan minuman yang dikonsumsi pada lembar catatan asupan yang diberikan, sesuai dengan pengarahannya yang diberikan
- Bersedia untuk diukur berat badan, tinggi badan, tekanan darah
- Bersedia dilakukan pengambilan darah untuk pemeriksaan laboratorium

Saya dan keluarga mengerti bahwa jika masih memerlukan penjelasan, saya akan mendapatkan jawaban dari peneliti dr. Dyah Maria Wahyuningtyas.

Dengan menandatangani formulir ini, saya setuju ikut dalam penelitian ini.

Jakarta, 2009

Mengetahui
 Penanggung Jawab,

Menyetujui
 Peserta Penelitian,

(dr. Dyah Maria Wahyuningtyas)

(.....)

Universitas Indonesia

Formulir A4

Kode

--	--	--

Lembar Seleksi dan Riwayat Penyakit

Nama : _____

No	Kriteria	Ya (✓)	Tidak (✓)
A	Kriteria Penerimaan		
1	Umur 25-44 tahun		
2	IMT 18,5-29,9 kg/m ² (BB ₁ :kg; BB ₂ :kg; Rerata BB:kg; TB ₁ :cm; TB ₂ :cm; Rerata TB:cm; IMT:kg/m ²)		
3	Tidak merokok		
4	Tidak mengonsumsi suplemen antioksidan/vitamin		
5	Tidak mengonsumsi obat yang mempengaruhi metabolisme lipid (fibrat/satin/steroid/antihipertensi) atau jamu		
6	Tidak sedang hamil		
7	Tekanan darah <140/90 (TD ₁ :mmHg; TD ₂ :mmHg; Rerata TD:mmHg)		
8	Menyetujui <i>Informed Consent</i>		
B	Kriteria Penolakan		
1	Kolesterol total < 200 mg/dL atau ≥ 240 mg/dL		
2	Gula darah puasa ≥ 126 mg/dL		
3	SGOT ≥ 27 U/L		
4	SGPT ≥ 34 U/L		
5	Ureum > 43 mg/dL		
6	Kreatinin > 0,9 mg/dL		
	Dalam keluarga ada yang menderita penyakit hiperkolesterolemia (.....)		

Formulir A5

Kode

--	--	--

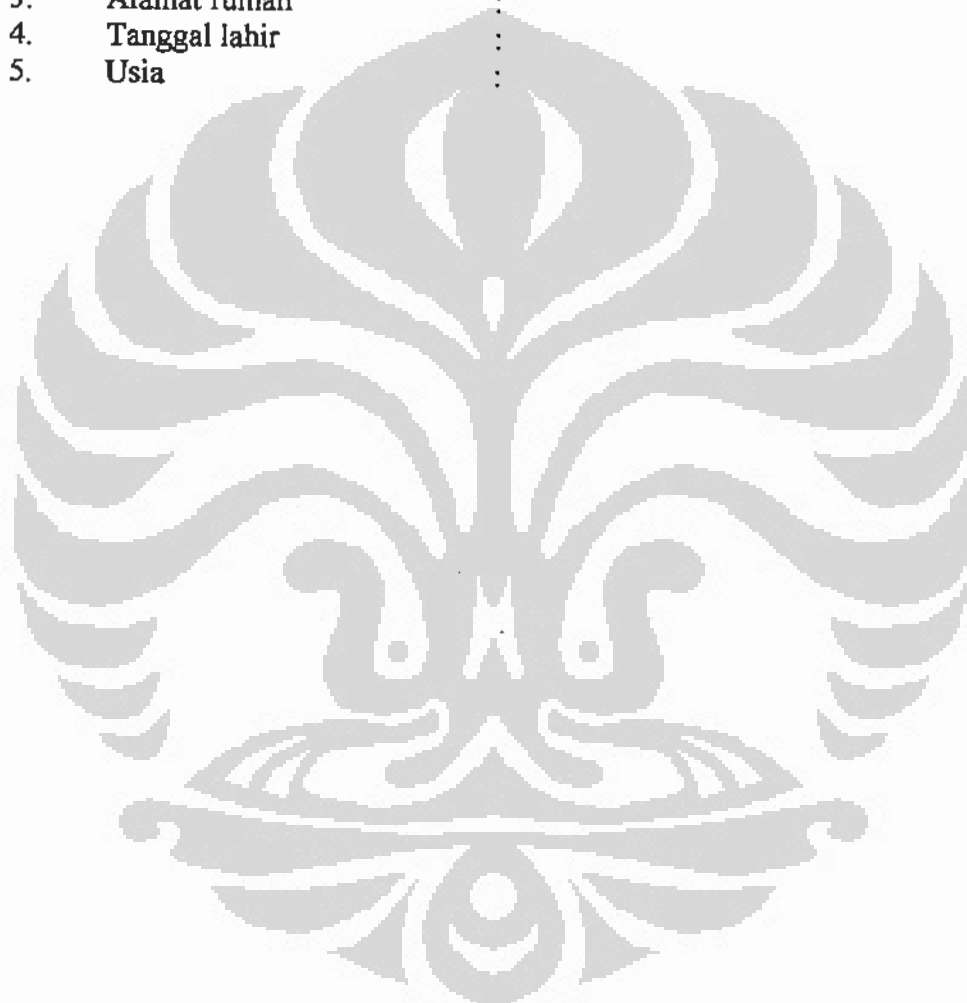
Data Karakteristik Subyek

Diisi oleh Petugas

Tanggal : _____

Petugas : _____

1. Nama
2. No. Telepon
3. Alamat rumah
4. Tanggal lahir
5. Usia

**Universitas Indonesia**

Formulir B2

Kode

--	--	--

Lembar Kepatuban dan Keluhan Subyek

Nama :

No	Hari/Tanggal	Minum Jus Anggur (beri tanda ✓)		Keluhan
		Ya	Tidak	
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				

Pemeriksa :

Tanggal :

Lampiran 4
Form C1

Kode

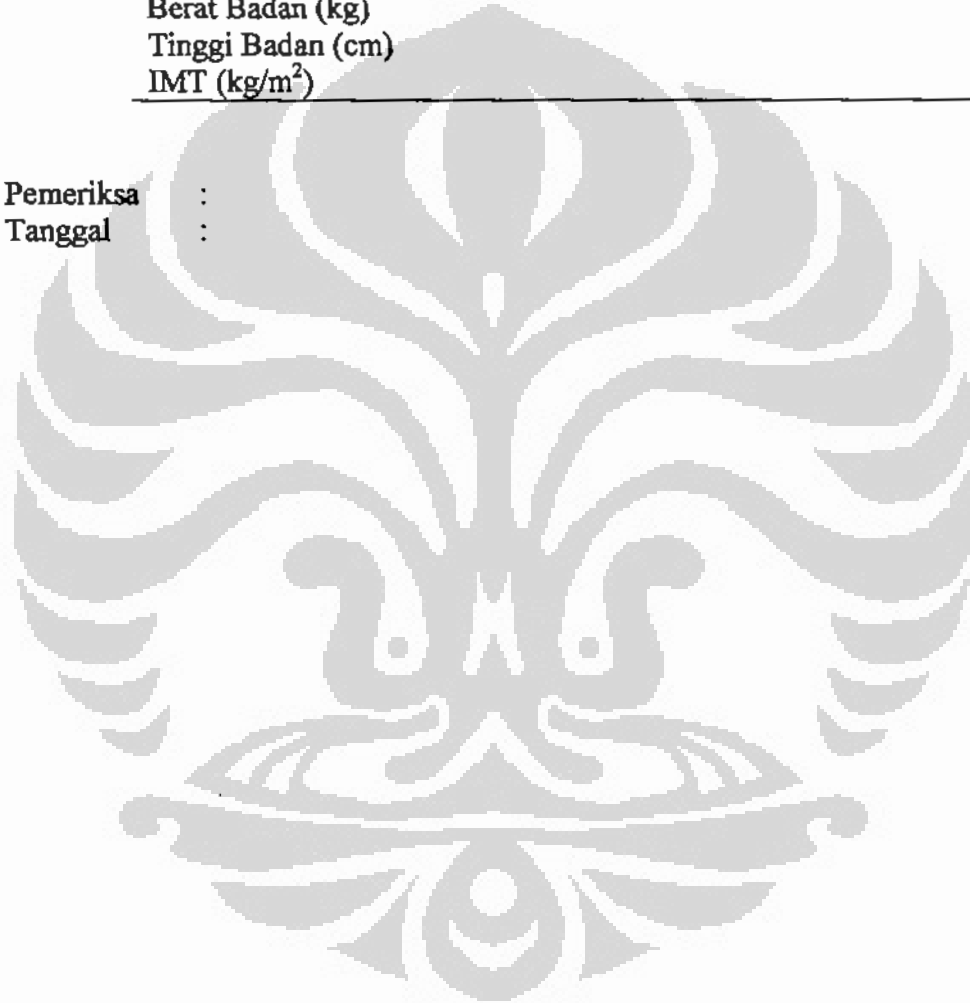
--	--	--

Lembar Data Pemeriksaan Antropometri

Nama :

Pengukuran	Hasil	
	H0	H15
Berat Badan (kg)		
Tinggi Badan (cm)		
IMT (kg/m ²)		

Pemeriksa :
Tanggal :



Universitas Indonesia

Form C2

Kode

--	--	--

Lembar Data Pemeriksaan Laboratorium

Nama :

Sebelum Penelitian

Gula Darah Puasa =

SGOT =

SGPT =

Ureum =

Kreatinin =

Pemeriksaan	Hasil	
	H0	H15
Kolesterol total serum (mg/ dL)		
NO serum ($\mu\text{mol/L}$)		

Lampiran 5**Prosedur Randomisasi Sederhana
(Menggunakan tabel angka random)**

1. Setelah didapatkan subyek penelitian, dilakukan randomisasi sederhana untuk membagi menjadi dua kelompok yaitu P atau K.
2. Ditentukan kelompok P untuk angka 0 sampai 4, sedangkan kelompok K untuk angka 5 – 9.
3. Dengan mata tertutup, dijatuhkan sebuah pensil pada tabel angka random. Kemudian dipilih angka yang terdekat dengan tanda pensil tersebut, dan dibaca ke kanan.
4. Didapatkan urutan angka 512500843384085301 dan seterusnya.
5. Berdasarkan urutan angka tersebut maka dapat ditentukan urutan kelompok yaitu: KPPKPPKPPPKPPKKPPP dan seterusnya.

Lampiran 6.

Contoh Menu Diet Seimbang

Dalam Satuan Penukar

Waktu	Bahan Makanan	Menu 1	Menu 2	Energi (kcal)		
				1700	1900	2100
07.00	Karbohidrat	Mie goreng	Roti panggang	1	1 ½	1 ½
	Hewani	Telur rebus	Telur dadar	1	1	1
	Nabati			½	½	1
	Sayur	Sawi hijau	Selada	S	S	S
	Minyak			1	2	2
10.00	Buah	Melon	Pepaya	1	1	1
13.00	Karbohidrat	Nasi	Nasi	2	2	2
	Hewani	Ayam goreng	Ikan goreng	1	1	1
	Nabati	Tahu bacem	Tempe bacem	1	1	1
	Sayur	Sayur buncis	Sayur urap	S	S	S
	Minyak			2	2	2
16.00	Roti	Kue basah	Kue kering	-	-	1
	Buah	Nenas	Jeruk	1	1	1
19.00	Karbohidrat	Nasi	Nasi	2	2	2
	Hewani	Tempe bacem	Ayam bakar	1	1	1
	Nabati	Perkedel	Tahu isi	1	1	1
	Sayur	Sayur bening	Sayur terong	S	S	S
	Minyak			2	2	2

Keterangan :

- Komposisi diet seimbang : karbohidrat 60%, lemak 25%, protein 15% dari kalori total.
- S : sekehendak.
- Jumlah penukar setiap waktu makan dapat disesuaikan dengan kebiasaan makan individu, tanpa mengubah jumlah penukar total sehari..

Lampiran 7.

Lembar Pembatasan Konsumsi Makanan Masa *Run-in* dan Perlakuan

Jenis makanan	Tidak dikonsumsi/dibatasi	Ukuran
Anggur	Tidak dikonsumsi	-
Strawberri	Tidak dikonsumsi	-
Leci	Tidak dikonsumsi	-
Apel	Tidak dikonsumsi	-
Wine	Tidak dikonsumsi	-
Mangga	Dibatasi	1 potong sedang
Nanas	Dibatasi	1 potong sedang
Delima	Dibatasi	1 buah
Pisang	Dibatasi	1 buah
Jeruk	Dibatasi	2 buah
Kiwi	Dibatasi	2 buah
Semangka	Dibatasi	2 potong
Melon	Dibatasi	2 potong
Tomat	Dibatasi	2 buah
Wortel	Dibatasi	1 buah
Alpukat	Dibatasi	2 buah
Brokoli	Dibatasi	1 potong
Kembang kol	Dibatasi	1 potong
Bawang merah	Dibatasi	10 siung
Bawang putih	Dibatasi	5 siung
Teh	Dibatasi	2 gelas
Kopi	Dibatasi	1 gelas
Coklat	Dibatasi	1 gelas
Susu kedelai	Dibatasi	1 gelas

Keterangan:

Konsumsi yang dibatasi adalah dalam keadaan segar, tanpa proses pengolahan.

Bagi yang tidak tersebut dalam daftar diatas, maka dapat dikonsumsi seperti biasa.

Lampiran 8

Kode

--	--	--

Lembar Indeks Aktifitas Fisik (IAF)

Nama subyek :

Olah raga saat ini :

(Lingkari pada nilai yang tertera)

1. Frekuensi (F)

Frekuensi	Nilai
Kurang sekali dalam sebulan	1
Beberapa kali per bulan	2
1 – 2 kali/minggu	3
3 – 5 kali/minggu	4
Setiap hari atau hampir setiap hari/minggu	5

2. Durasi (D)

Durasi	Nilai
Kurang dari 10 menit	1
10 – 20 menit	2
20 – 30 menit	3
> 30 menit	4

3. Intensitas (I)

Intensitas	Nilai
Ringan mis: jalan santai, 2,5 mph	1
Sedang mis: basket, bukan kompetisi	2
Cukup berat (berkeringat) mis: tenis tunggal	3
Berat (berkeringat) mis: bersepeda, aktivitas berat	4
Sangat berat (berkeringat) mis: lari cepat > 7,5 mph	5

NILAI : $I \times D \times F = \dots\dots\dots$

Interpretasi:

Nilai Total	Indeks Aktivitas Fisik
1 – 20	E = Rendah
21 – 40	D = Cukup
41 – 60	C = Rata-rata
61 – 80	B = Baik
81 – 100	A = Sangat baik

Catatan: Bila saudara melakukan dua atau lebih jenis olahraga, Indeks Aktivitas Fisik Saudara (nilai total) adalah jumlah dari dua atau lebih IAF.



Contoh Aktivitas Fisik

Aktivitas	MET
Sepeda di tempat, 50 W, sangat ringan, untuk latihan	3.0
Sepeda, <10 mph, umum, senggang, ke tempat kerja atau untuk santai	4.0
Sepeda, di tempat, 100 W, ringan, untuk latihan	5.5
Sepeda, di tempat, 150 W, sedang	7.0
Sepeda, di tempat, 200 W, berat	10.5
Kalistenik, ringan atau sedang, umum	4.5
Kalistenik, berat	8.0
Angkat beban, ringan atau sedang	3.0
Olahraga kesehatan bersama, umum	5.5
Treadmill, bertingkat, umum	6.0
Dayung, di tempat, 50 W, ringan	3.5
Dayung, di tempat, 100 W, ringan	7.0
Dayung, di tempat, 150 W, berat	8.5
Peregangan	4.0
Pelatih kelas aerobik	6.0
Latihan aerobik di air, kalistenik di air	4.0
Aerobik, umum	6.0
Aerobik, low impact (ringan)	5.0
Aerobik, high impact (tinggi, berat)	7.0
Menari (dancing), umum	4.5
Menari, perlahan	3.0
Menari, cepat	5.5
Jogging, umum	7.0
Lari, 5 mph (12 min/mile)	8.0
Lari, 6 mph (10 min/mile)	10.0
Lari, 7 mph (8.5 min/mile)	11.5
Lari, 7.5 mph (8 min/mile)	12.5
Lari, di tempat	8.0
Badminton, bukan pertandingan, tunggal dan ganda, umum	4.5
Basket, bukan pertandingan, umum	6.0
Basket, pertandingan	8.0
Basket, memasukkan bola (shooting)	4.5
Bilyard	2.5
Bowling	3.0
Golf, umum	4.5
Judo, karate, tae kwan do	10.0
Panjat tebing, umum	8.0
Panjat tebing, cepat	12.0
Lompat tali, sedang, umum	10.0
Lompat tali, lambat	8.0
Sepakbola, santai, umum	7.0

Aktivitas	MET
Sepakbola, pertandingan	10.0
Tenis, umum	7.0
Tenis, tunggal	8.0
Tenis, ganda	6.0
Volley, bukan pertandingan	3.0
Volley, pertandingan	4.0
Jalan kurang dari 2 mph, lambat, permukaan datar	2.5
Jalan 2.5 mph, permukaan normal	3.0
Jalan 3.5 mph, bertingkat, langkah pendek, permukaan normal	4.0
Jalan 3.5 mph, naik bukit	6.0
Jalan 4 mph, level, permukaan datar, langkah pendek	4.0
Jalan 4.5 mph, level, permukaan normal, langkah sangat pendek	4.5
Jalan untuk santai, jalan bersama anjing	3.5
Jalan ke tempat kerja atau kelas	4.0
Menyelam (snorkeling)	5.0
Softball atau baseball, cepat atau lambat, umum	5.0
Surfing	3.0
Renang laps, gaya bebas, cepat, upaya berat	10.0
Renang laps, gaya bebas, lambat, sedang atau ringan	8.0
Renang, gaya punggung, umum	8.0
Renang, gaya dada, umum	10.0
Skating, ice, umum	7.0

Kategori aktivitas fisik

1. Aktivitas fisik ringan
< 5 MET atau < 6 kkal/menit
2. Aktivitas fisik sedang
5 – 7 MET atau 6 – 8 kkal/menit
3. Aktivitas fisik berat
>7 MET atau > 8 kkal/menit

Lampiran 9

Prosedur Pemeriksaan Kadar Kolesterol Total Serum

Metoda : *Enzymatic*
 Alat ukur : *ADVIA 1800*

Alat dan Bahan

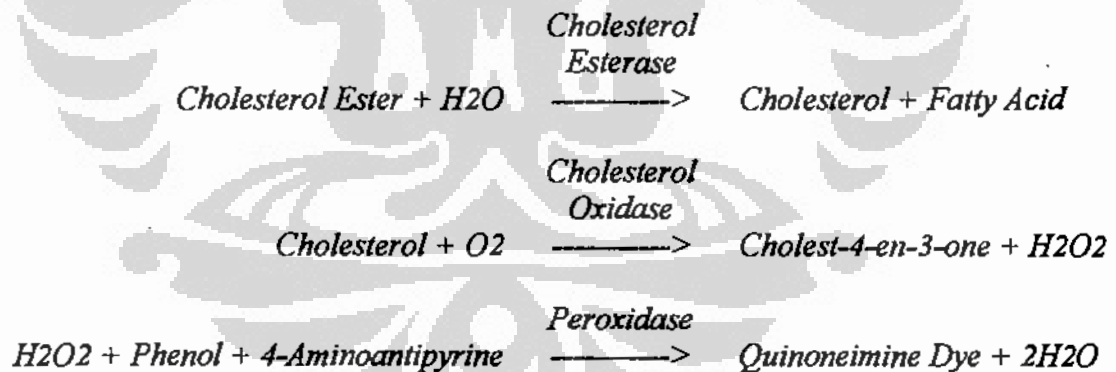
Reagent 1, berisi komponen berikut:

Komponen	Konsentrasi
1. <i>4-aminoantipyrine</i>	: 0,25 mmol/L
2. <i>Phenol</i>	: 6,00 mmol/L
3. <i>Peroxidase (horseradish)</i>	: 0,50 U/mL
4. <i>Cholesterol esterase (Pseudomonas)</i>	: 0,20 U/mL
5. <i>Cholesterol oxidase (Nocardia)</i>	: 0,10 U/mL
6. <i>Sodium azide</i>	: 0,09 %

Prinsip dari Prosedur

Kolesterol ester dihidrolisa oleh kolesterol esterase menjadi kolesterol dan asam lemak bebas. Kolesterol dikonversi menjadi kolesterol-3-one oleh kolesterol oksidase dalam hydrogen peroxide, 4-amino antipyrine dan phenol dibawah pengaruh katalitis dari peroxidase. Absorbansi dari sampel yang kompleks, diukur sebagai sebuah titik akhir dari reaksi pada 505/694 nm.

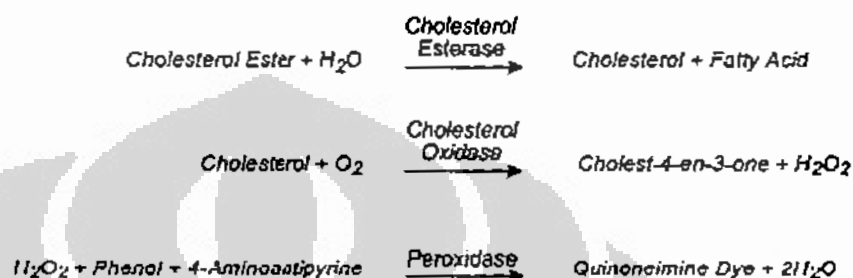
Persamaan Reaksi



Principles of the Procedure



The cholesterol esters are hydrolyzed by cholesterol esterase to cholesterol and free fatty acids. The cholesterol is converted to cholesterol-3-one by cholesterol oxidase in the presence of oxygen to form hydrogen peroxide. A colored complex is formed from hydrogen peroxide, 4-aminopyridine and phenol under the catalytic influence of peroxidase. The absorbance of the complex is measured as an endpoint reaction at 505/694 nm.

Reaction Equation



Reagents

The reagents are packaged as listed below. Components of the package are available as a kit only.

REF (PN) Container Size	Symbol	Contents	Amount	No. of Tests
01482198 (BU1-4124-U1)		Cholesterol Reagent		4 x 675 ADVIA 1650/
70-mL		Reagent 1	4 x 68 mL	1800/2400 4 x 530 ADVIA 1200

Components and Concentrations

Reagent	Component	Concentration
Reagent 1	4-aminopyridine	0.25 mmol/L
	Phenol	6.00 mmol/L
	Peroxidase (horseradish)	> 0.50 U/ml
	Cholesterol esterase (<i>Pseudomonas</i>)	≥ 0.20 U/mL
	Cholesterol oxidase (<i>Nocardia</i>)	≥ 0.10 U/mL
	Sodium azide	0.09 %

Lampiran 10

Prosedur Pemeriksaan Kadar NO Serum

Metoda : *Colorimetric Griess Assays*

Alat ukur : *Model 680*

Alat dan Bahan

- | | |
|--|----------|
| 1. <i>Nitrate/Nitrite Assay Buffer</i> | : 1 vial |
| 2. <i>Nitrate Reductase Enzyme Preparation</i> | : 2 vial |
| 3. <i>Nitrate Reductase Cofactor Preparation</i> | : 2 vial |
| 4. <i>Nitrate Standart</i> | : 1 vial |
| 5. <i>Nitrite Standart</i> | : 1 vial |
| 6. <i>Griess Reagent I</i> | : 2 vial |
| 7. <i>Griess Reagent II</i> | : 2 vial |
| 8. <i>96-Well Plate</i> | : 3 buah |
| 9. <i>Plate Cover Sheet</i> | : 3 buah |
| 10. <i>Plate Reader 540 nm</i> | : 1 buah |

Persiapan Reagen

Beberapa komponen berupa konsentrasi sehingga perlu diencerkan sebelum digunakan.

1. *Assay Buffer*

Larutkan material dalam botol *Assay Buffer* menjadi 100 mL dengan air UltraPure. *Assay Buffer* ini digunakan untuk melarutkan sample sesuai kebutuhan. Buffer ini dapat disimpan secara stabil selama 2 bulan pada suhu 4°C.

2. *Nitrat reduktase*

Rekonstitusi nitrat reduktase dengan 1,2 mL *Assay Buffer*. Simpan dalam es selama penggunaan. Simpan pada suhu -20°C ketika tidak digunakan. Pembekuan dan pencairan larutan ini sebaiknya hanya dilakukan satu kali.

3. *Enzyme Cofactors*

Rekonstitusi enzyme cofactors dengan 1,2 mL *Assay Buffer*. Simpan dalam es selama penggunaan. Simpan pada suhu -20°C ketika tidak digunakan. Pembekuan dan pencairan larutan ini sebaiknya hanya dilakukan satu kali.

4. *Nitrate standart*

Buka tutup botol secara perlahan untuk meminimalkan guncangan pada bubuk konsentrasi. Rekonstitusi isi botol dengan 1,0 mL *Assay Buffer*. Aduk dan campur secara merata untuk menyakinkan semua bubuk terlarut dengan baik. Simpan pada suhu 4°C ketika tidak digunakan. Larutan ini dapat disimpan secara stabil selama 4 bulan pada suhu 4°C.

5. *Nitrite standart*

Buka tutup botol secara perlahan untuk meminimalkan guncangan pada bubuk konsentrasi. Rekonstitusi isi botol dengan 1,0 mL *Assay Buffer*. Aduk dan campur secara merata untuk menyakinkan semua bubuk terlarut dengan

baik. Simpan pada suhu 4°C ketika tidak digunakan. Larutan ini dapat disimpan secara stabil selama 4 bulan pada suhu 4°C.

6. Griess Reagents R1 dan R2

Tidak diperlukan penambahan apapun pada reagen ini, karena reagen ini siap digunakan. Sebaiknya disimpan pada suhu 4°C.

Prosedur Kerja

Pengukuran kadar nitrat dan nitrit

1. Tambahkan 200 μL air atau Assay Buffer ke dalam sumur blangko.
2. Tambahkan larutan Assay Buffer ke dalam sampel sampai volume 80 μL dan masukkan dalam sumur dalam urutan yang ditentukan.
3. Tambahkan 10 μL campuran *Enzyme Cofactor* ke dalam setiap sumur (standart dan yang tak diketahui).
4. Tambahkan 10 μL campuran *Nitrat Reduktase* ke dalam setiap sumur (standart dan yang tak diketahui).
5. Tutup *plate* dengan *plate cover* dan inkubasikan pada suhu ruangan selama 1 jam.
6. Setelah mencapai waktu inkubasi, tambahkan 50 μL Griess Reagent R1 ke dalam setiap sumur (standart dan yang tak diketahui)
7. Segera tambahkan 50 μL Griess Reagent R2 ke dalam setiap sumur (standart dan yang tak diketahui).
8. Biarkan selama 10 menit dalam suhu ruangan supaya terbentuk warna.
9. Baca absorbansi pada 540 nm menggunakan alat ukur.

Perhitungan

Pengurangan blangko

- Hitung rata-rata nilai absorbansi dari sumur blangko dan kurangkan nilai ini dari nilai absorbansi dari semua sumur sampel.

Plotting kurva standart

- Buat plot dari nilai absorbansi pada 540 nm sebagai fungsi dari konsentrasi nitrat atau nitrit. Kurva standart nitrat digunakan untuk menentukan konsentrasi total nitrat dan nitrit, sedangkan kurva standart nitrit digunakan untuk menentukan konsentrasi nitrit saja.



PRE-ASSAY PREPARATION

Preparation of Reagents

Some of the kit components are in lyophilized or concentrated form and need to be reconstituted or diluted prior to use. Follow the directions carefully to ensure proper volumes of water or Assay Buffer are used to reconstitute or dilute the vial components.

1. Assay Buffer

Dilute the contents of the Assay Buffer vial to 100 ml with UltraPure water (Milli-Q or equivalent). This Assay Buffer should be used for dilution of samples as needed prior to assay. The buffer will be stable for approximately 2 months at 4°C.

2. Nitrate Reductase (vial #2)

Reconstitute the contents of the vial with 1.2 ml of Assay Buffer. Keep on ice during use. Store at -20°C when not in use. Freezing and thawing of this solution should be limited to 1 time.

3. Enzyme Cofactors (vial #3)

Reconstitute the contents of the vial with 1.2 ml of Assay Buffer. Keep on ice during use. Store at -20°C when not in use. Freezing and thawing of this solution should be limited to 1 time.

4. Nitrate standard (vial #4)

Remove the vial stopper slowly to minimize disturbance of the lyophilized powder. Reconstitute the contents of the vial with 1.0 ml of Assay Buffer. Vortex and mix sufficiently to ensure all powder in the vial, including any on the stopper, is in solution. Store at 4°C when not in use (*do not freeze*). The reconstituted standard will be stable for about four months when stored at 4°C.*

5. Nitrite standard (vial #5)

Remove the vial stopper slowly to minimize disturbance of the lyophilized powder. Reconstitute the contents of the vial with 1.0 ml of Assay Buffer. Vortex and mix sufficiently to ensure all powder in the vial, including any on the stopper, is in solution. Store at 4°C when not in use (*do not freeze*). The reconstituted standard will be stable for about four months when stored at 4°C.*

6. Griess Reagents R1 and R2 (vials #6 and #7)

Do not add any water or Assay Buffer to these reagents, as they are ready for use. These reagents should be stored at 4°C (*do not refreeze*).

*[NOTE: After reconstitution the standards must be further diluted prior to performing the assay (see pages 7 for details).]

PIPETTING HINTS

- It is recommended that a repeating pipettor be used to deliver substrate, enzymes, and color development reagents to the wells. This saves time and helps to maintain more precise times of incubation.
- Use different tips to pipet the Assay Buffer, standard, sample, and color development reagents.
- Before pipetting each reagent, equilibrate the pipet tip in that reagent (i.e., fill the tip and expel the contents; repeat several times).
- Do not expose the pipet tip to the reagent(s) already in the well.

Sample Preparation

The kit has been validated in urine, culture media, and plasma. No sample purification from these sources is necessary other than some special instructions as described below. Store samples at -20°C or -80°C after collection.

1. Urine samples

Urine can be used directly after dilution to the proper concentration in Assay Buffer. Urine contains relatively high levels of nitrate (200-2,000 µM), so dilutions of approximately 1:10 - 1:50 may be necessary.

2. Culture Media

Some types of tissue culture media contain very high nitrate levels (i.e., RPMI 1640). These types of media should not be used for cell culture if the goal of an experiment is to measure small changes in nitrate levels. Cellular nitrate/nitrite production can be quantitated by subtracting the level of nitrate/nitrite present in the media (in the absence of cells) from the total nitrate/nitrite level present during cell growth. The effect of media components on color development can be assessed by making a nitrite standard curve in the presence of a fixed volume of the culture media (40 μ l works well) and comparing it to a nitrite standard curve made in buffer alone.

3. Plasma and serum samples

Ultrafilter plasma or serum samples through a 10 or 30 kDa molecular weight cut-off filter using a commercially available centrifuge or microfuge ultrafiltration device. The filters, supplied through Amicon or Millipore, should be pre-rinsed with UltraPure water prior to ultrafiltration of serum or plasma. Ultrafiltration will reduce background absorbance due to the presence of hemoglobin and improve color formation using the Griess reagent. Assay for nitrate and/or nitrite using a maximum of 40 μ l of the filtrate. The conversion of nitrate to nitrite requires 3 hours for completion.

Heparinized plasma may form a precipitate upon addition of Griess Reagent R1, thus making the sample unusable for analysis. Citrate or EDTA are recommended as anticoagulants for plasma preparation.

4. Tissue homogenates

Homogenize the sample in PBS (pH 7.4) and centrifuge at 10,000 \times g for 20 minutes. Ultracentrifuge the supernatant solution at 100,000 \times g for 30 minutes (centrifugation at 100,000 \times g is optional, but will increase filtration rates). Ultrafilter using a 10 or 30 kDa molecular weight cut-off filter using a commercially available centrifuge or microfuge ultrafiltration device. The filters, supplied through Amicon or Millipore, should be pre-rinsed with UltraPure water prior to ultrafiltration. Assay the sample for nitrate and/or nitrite using a maximum of 40 μ l of the filtrate. The conversion of nitrate to nitrite requires 3 hours for completion.

Plate Configuration

There is no specific pattern for using the wells on the plate. However, it is necessary to have some wells (at least 2) designated as absorbance blanks (containing 200 μ l of Assay Buffer or water). The absorbance of these wells must then be subtracted from the absorbance measured in all the other wells. Standard curves for nitrate and nitrite must also be included. If you plan to measure only total NO products (nitrate + nitrite), only the nitrate standard curve is required. If only nitrite is being measured, then only the nitrite standard curve is needed. The wells for the standard curves have been designated (as in A1-H12) in the instructions below. However, these standard curves can be placed in any wells you choose. The remaining wells on the plate can then be used for the assay of your samples. We suggest you record the contents of each well on the template sheets provided (See page 10).

This kit provides sufficient cofactors and reagents to run two 96-well plates measuring total NO ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$) in all the wells. If you wish to test some samples for NO_2^- only (where reductase and cofactors are not required), there is sufficient Griess Reagent R1 and R2 to run a third 96-well plate of nitrite determinations. All three plates are supplied with this kit.



MEASUREMENT OF NITRATE + NITRITE

Preparation of nitrate standard curve

A nitrate standard curve must be performed in order to quantitate sample nitrate + nitrite concentrations. In a clean test tube place 0.9 ml of Assay Buffer. To this, add 0.1 ml of reconstituted nitrate standard and vortex. The concentration of this stock standard is 200 μM . Use this standard (200 μM) for the preparation of the nitrate standard curve as described below. The standard curve for nitrate is prepared by addition of reagents to the plate wells in the following way:

Well	Nitrate Standard (μl)	Assay Buffer (μl)	Final Nitrate Concentration* (μM)
A1, A2	0	80	0
B1, B2	5	75	5
C1, C2	10	70	10
D1, D2	15	65	15
E1, E2	20	60	20
F1, F2	25	55	25
G1, G2	30	50	30
H1, H2	35	45	35

*The concentration is calculated for the final 200 μl assay volume after addition of the Griess Reagents.

Preparation of Samples for total nitrate + nitrite measurement

Samples containing nitrate (with or without nitrite) can be assayed by addition of up to 80 μl (40 μl with plasma or serum) of sample per well and should be done in triplicate. When using less than 80 μl of sample, the volume must be adjusted to 80 μl by addition of the appropriate amount of Assay Buffer. When necessary, dilution of samples should be done using the Assay Buffer solution. In the event that the approximate concentration of nitrate or nitrite is completely unknown, we recommend that several different dilutions of the sample be made.

The absorbance of the samples should be between 0.05 and 1.2 absorbance units, since the plate reader will give the most accurate values when the absorbance is in this range. In addition, high absorbance values imply high nitrate levels. Under these conditions, there may be incomplete conversion of nitrate to nitrite. The detection limit of the assay is approximately 1 μM nitrite. When using 80 μl of sample, this translates into 2.5 μM nitrate in the original sample.

Performing the assay

1. Add 200 μl of water or Assay Buffer to the blank wells. Do not add any other reagents to these wells.
2. Add up to 80 μl of sample or sample dilutions to the wells in a pattern you choose. The final volume must be adjusted to 80 μl using the Assay Buffer solution. [NOTE: Plasma samples should be assayed with no more than 40 μl when undiluted samples are used (Samples which have been diluted 1:2 or greater can use up to 80 μl in the assay). Caution should be taken when pipetting plasma samples to ensure no bubbles enter to the well as this will lead to erroneous results.]
3. Add 10 μl of the Enzyme Cofactor mixture (vial #3) to each of the wells (standards and unknowns).
4. Add 10 μl of the Nitrate Reductase mixture (vial #2) to each of the wells (standards and unknowns).
5. Cover the plate with the plate cover and incubate at room temperature for 1 hour. [NOTE: This incubation time should be increased to 2 hours when assaying tissue culture medium, and increased to 3 hours when assaying plasma or tissue nitrate + nitrite concentrations. It is not necessary to shake the plate during incubation.]
6. After the required incubation time, add 50 μl of Griess Reagent R1 (vial #6) to each of the wells (standards and unknowns).
7. Immediately add 50 μl of Griess Reagent R2 (vial #7) to each of the wells (standards and unknowns).
8. Allow the color to develop for 10 minutes at room temperature. It is not necessary to cover the plate. (The 10 minute incubation is optimal for color development. However, if the plate has been left to develop for longer time periods the data is still valid, provided the Griess reagents have been added to the standard curve and unknowns at the same time. Developing the standard curve at the same time as the unknowns ensures the presence of an accurate control.)
9. Read the absorbance at 540 nm or 550 nm using a plate reader.



MEASUREMENT OF NITRITE

Preparation of Nitrite standard curve

Nitrite concentrations can be measured directly by performing the assay in the absence of substrate or enzymes. In a clean test tube place 0.9 ml of Assay Buffer. To this, add 0.1 ml of reconstituted nitrite standard and vortex. Use this diluted standard (200 μM) for the preparation of the nitrite standard curve as described below. The nitrite standard curve is prepared as follows:

Well	Nitrite Standard (μl)	Assay Buffer* (μl)	Final Nitrite Concentration** (μM)
A1, A2	0	100	0
B1, B2	5	95	5
C1, C2	10	90	10
D1, D2	15	85	15
E1, E2	20	80	20
F1, F2	25	75	25
G1, G2	30	70	30
H1, H2	35	65	35

*UltraPure water can also be used

**The concentration is calculated for the final 200 μl assay volume after addition of the Griess reagents.

Measurement of sample nitrite

Measurement of samples with unknown nitrite concentrations can be done using up to 100 μl of sample. When using less than 100 μl of sample for nitrite determination, the volume must be adjusted to 100 μl using Assay Buffer or water. Samples can be diluted in water or Assay Buffer. Once again it is best to keep the absorbance of the sample at approximately 0.05-1.2. When using 100 μl of sample the detection limit for nitrite is approximately 2 μM in the original sample.

Performing the assay

1. Add 200 μl of water or Assay Buffer to the blank wells. Do not add any other reagents to these wells.
2. Add up to 100 μl of sample to the chosen wells. When using less than 100 μl be sure to adjust the volume to 100 μl using Assay Buffer or water.
3. Add 50 μl of Griess Reagent R1 (vial #6) followed by addition of 50 μl Griess Reagent R2 (vial #7) to each of the wells (standards and unknowns).
4. Allow the color to develop for 10 minutes.
5. Measure the absorbance at 540 or 550 nm.

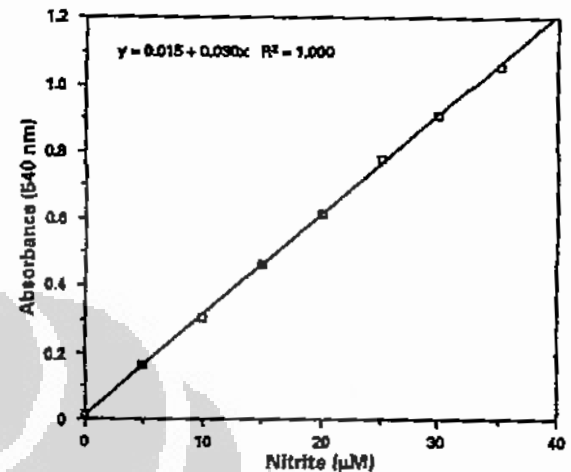
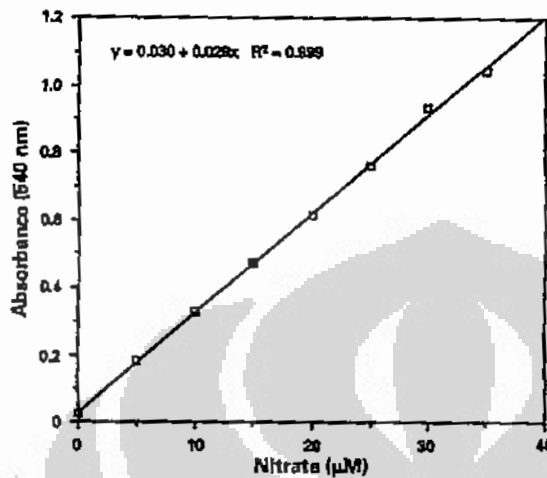
CALCULATIONS

Subtract the blanks

Average the absorbance value of the blank wells and subtract this from the absorbance values of all the other wells.

Plotting the standard curves

Make a plot of absorbance at 540 or 550 nm as a function of nitrate OR nitrite concentration. The nitrate standard curve is used for determination of total nitrate + nitrite concentration, whereas the nitrite standard curve is used for the determination of nitrite alone. In theory these two standard curves should be identical however, in practice a small discrepancy often occurs. Examples of typical standard curves are shown on page 9.



Determination of sample nitrate or nitrite concentrations

$$[\text{Nitrate} + \text{Nitrite}] (\mu\text{M}) = \left(\frac{A_{540} - y\text{-intercept}}{\text{slope}} \right) \left(\frac{200 \mu\text{l}}{\text{volume of sample used } (\mu\text{l})} \right) \times \text{dilution}$$

$$[\text{Nitrite}] (\mu\text{M}) = \left(\frac{A_{540} - y\text{-intercept}}{\text{slope}} \right) \left(\frac{200 \mu\text{l}}{\text{volume of sample used } (\mu\text{l})} \right) \times \text{dilution}$$

$$[\text{Nitrate}] (\mu\text{M}) = [\text{Nitrate} + \text{Nitrite}] - [\text{Nitrite}]$$

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Interferences

Antioxidants will interfere with the color development reaction. Azide, ascorbic acid, dithiothreitol, and mercaptoethanol will interfere with color development when present at concentrations as low as 100 µM. Alkyl amines, most sugars, lipids, or amino acids (except those containing thiol groups) do not interfere.⁴ Phosphate concentrations greater than approximately 50 mM will interfere with the conversion of nitrate to nitrite.

Sensitivity

When using the maximum amount of sample for the nitrate/nitrite assay (80 µl), the detection limit is 2.5 µM. The detection limit for plasma is higher since only 40 µl of sample can be used. For the nitrite assay a maximum volume of 100 µl can be used. In this case the detection limit is approximately 2.0 µM.

TROUBLESHOOTING

Problem: Erratic values; dispersion of duplicates.

Cause: Poor pipetting/technique. Bubble in the well.

Problem: No color development in nitrate standard curve.

Cause: Cofactors or enzymes (or both) not added.

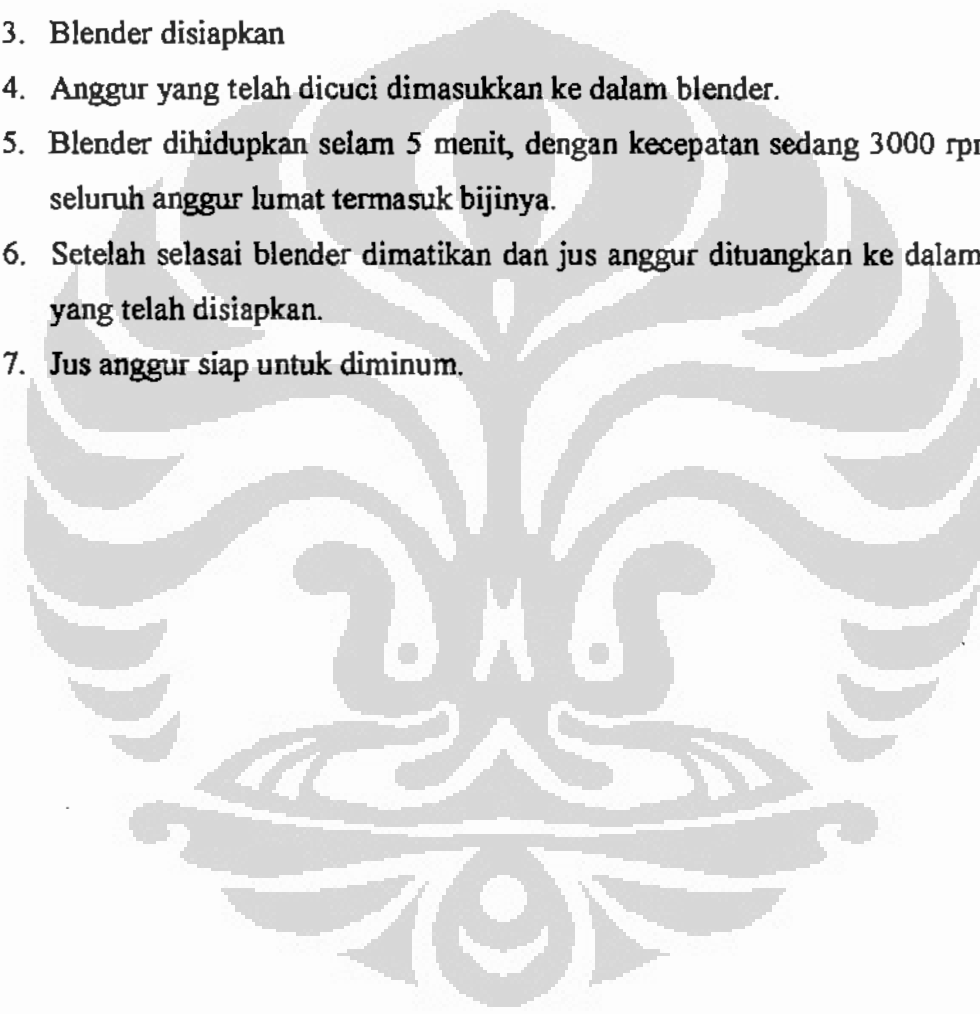
Solution: You will need to do a new standard curve. If you have not added one of these reagents to the sample wells, you will need to repeat the experiment.

Lampiran 11

Prosedur Pembuatan Jus Anggur

Prosedur pembuatan jus anggur sebagai berikut:

1. Anggur dicuci bersih dengan menggunakan larutan pembersih khusus untuk buah dan sayur, dengan air yang mengalir untuk membersihkan kotoran yang melekat.
2. Anggur ditimbang masing-masing sebanyak 300 gram.
3. Blender disiapkan
4. Anggur yang telah dicuci dimasukkan ke dalam blender.
5. Blender dihidupkan selama 5 menit, dengan kecepatan sedang 3000 rpm, sampai seluruh anggur lumat termasuk bijinya.
6. Setelah selesai blender dimatikan dan jus anggur dituangkan ke dalam gelas jus yang telah disiapkan.
7. Jus anggur siap untuk diminum.



DAFTAR RIWAYAT HIDUP

Nama : Dyah Maria Wahyuningtyas

Tempat, tanggal lahir : Gresik, 10 Oktober 1977

Agama : Kristen

Status : Menikah

Nama suami : Suarno Pranoto, ST

Nama anak : 1. Laurent Arsa Pandega
2. Gemma Larasati Puspawinata
3. Maria Harumi Dayaningtyas

Riwayat Pendidikan :

1. SDN Sidokumpul II Gresik (1984 -1990).
2. SMPN I Gresik (1990 – 1993).
3. SMAN 5 Surabaya (1993 – 1996).
4. Fakultas Kedokteran Umum Universitas Airlangga, Surabaya (1996 – 2002).

Riwayat Pekerjaan :

1. Dokter PTT Klinik Gereja Materdei, Semarang, Jawa Tengah (2002 – 2004).
2. Dokter PTT RSUD Wonogiri, Jawa Tengah (2004 – 2005).
3. Dokter PNS RSUD Wonogiri, Jawa Tengah (2005 – 2007).

Riwayat Organisasi :

1. Anggota Ikatan Dokter Indonesia
2. Anggota Muda Perhimpunan Dokter Gizi Medik Indonesia