



**TOKSISITAS RACUN *Physalia utriculus* DARI PERAIRAN PAPUMA
JEMBER TERHADAP ERITROSIT
SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

Oleh:

Graitia Yuli Ambarwati

NIM 142010101054

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS JEMBER

2018



**TOKSISITAS RACUN *Physalia utriculus* DARI PERAIRAN PAPUMA
JEMBER TERHADAP ERITROSIT
SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Pendidikan Dokter (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran (S. Ked)

Oleh:

Graita Yuli Ambarwati

NIM 142010101054

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS JEMBER

2018

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Kedua orang tua terkasih saya, Ayah H. Wijono Gutomo, S. Pd dan Ibu Hj. Lailatun Nikmah S.Pd , M. A yang senantiasa mendoakan dan memberikan dukungan tiada henti serta kasih sayang yang tiada tara disetiap langkah saya hingga saat ini, yang senantiasa selalu mendidik saya untuk menjadi manusia yang shalihah, bermoral, dan berhati mulia. Serta untuk kedua kakak saya Hendrik Agus Prasetyo, dan Naning Sakti Andriyani, dan kedua adik saya, Endah Hidayatul Fuadiah, dan Rafif Imam Wasis Abdillah yang telah menyisihkan waktu, kasih sayang, do'a, dan dukungan dalam menghadapi banyak hal selama ini.
2. Seluruh bapak ibu guru saya sejak taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi yang telah mendidik dan membimbing saya serta memberikan ilmu yang menjadikan saya hingga saat ini.
3. Teman-teman yang selalu ada saat suka dan duka, saling mengingatkan dalam kebenaran dan kesabaran;
4. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

MOTO

"Tetapi boleh jadi kamu tidak menyenangi sesuatu, padahal itu baik bagimu, dan boleh jadi kamu menyukai sesuatu, padahal itu tidak baik bagimu. Allah mengetahui sedangkan kamu tidak mengetahui."

(Terjemahan surat Al Baqarah: 216)*)



*) Kementerian Agama Republik Indonesia. 2010. *Al Qur'an Tajwid dan Terjemahannya Dilengkapi dengan Asbabun Nuzul dan Hadist Sahih*. Bandung: Sygma Publishing.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

nama : Graita Yuli Ambarwati

NIM : 142010101054

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Toksistas Racun *Physalia utriculus* dari Perairan Papuma Jember Terhadap Eritrosit Secara *In Vitro*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, Oktober 2018
Yang menyatakan,

Graita Yuli Ambarwati
NIM 142010101054

SKRIPSI

**TOKSISITAS RACUN *Physalia utriculus* DARI PERAIRAN PAPUMA
JEMBER TERHADAP ERITROSIT
SECARA *IN VITRO***

Oleh

Graita Yuli Ambrawati
NIM 142010101054

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama (DPU) : dr. Al Munawir, M. Kes., Ph. D

Dosen Pembimbing Anggota (DPA) : dr. Dini Agustina, M. Biomed

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Toksistas Racun *Physalia utriculus* dari Perairan Papuma Jember Terhadap Eritrosit Secara *In Vitro*” karya Graita Yuli Ambarwati telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Jumat, 12 Oktober 2018

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji:

Ketua,

Anggota I,

dr. Rini Riyanti, Sp. PK

NIP 19720328 199903 2 001

dr. Ayu Munawaroh Aziz, M. Biomed

NIP 19890313 2014 2 002

Anggota II,

Anggota III,

dr. Al Munawir, M. Kes., Ph. D

NIP 19690901 1999903 1 003

dr. Dini Agustina, M. Biomed

NIP 19830801 2008122 003

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember

dr. Supangat, M. Kes., Ph. D., Sp. BA

NIP 19730424 199903 1 002

RINGKASAN

Toksisitas Racun *Physalia utriculus* dari Perairan Papuma Jember Terhadap Eritrosit Secara In Vitro; Graitia Yuli Ambarwati, 142010101054; 2018; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Indonesia terkenal akan negara yang memiliki kekayaan alam yang berlimpah. Salah satunya kekayaan alam Indonesia adalah alam bawah laut yang kaya akan biota bawah laut baik flora maupun faunanya dan salah satunya adalah ubur-ubur. Ubur-ubur dapat bermanfaat bagi manusia dan dapat pula merugikan manusia. Salah satu hal yang merugikan dari ubur-ubur adalah sengatannya, karena ubur-ubur mengandung racun yang dapat menyebabkan gejala-gejala tertentu jika mengenai manusia. Kasus sengatan ubur-ubur di Indonesia yang dilaporkan dan tercatat selama tahun 2005 – 2009 terdapat 13 kasus sengatan ubur-ubur, dan 3 kasus diantaranya menyebabkan korban meninggal dunia.

Spesies yang sering ditemukan dan sering menyebabkan kasus sengatan ubur-ubur adalah *Physalia physalis* dan *Physalia utriculus*. Sengatan dari *Physalia utriculus* ini berbahaya bagi tubuh manusia, karena bisa menyebabkan gejala lokal maupun sistemik. Sengatan dari *Physalia utriculus* dapat menyebabkan tidak sadarkan diri, tidak terabanya denyut nadi, dan dilatasi pupil yang abnormal. Selain efek tersebut, racun dari *Physalia utriculus* juga dapat menyebabkan hipersensitivitas langsung yang berupa urtikaria, edema, dan bronkospasme. Toksin ubur-ubur dilaporkan juga termasuk fraksi hemolitik dan mematikan, dimana toksin tersebut mengandung neurotoksin dan kardiotoxin, yang mampu menyebabkan aritmia ventrikel dan serangan jantung.

Menurut uraian diatas didapatkan bahwa racun dari *Physalia utriculus* dapat menyebabkan beberapa masalah pada tubuh, baik lokal maupun sistemik, bahkan untuk kasus-kasus fatal dapat menyebabkan kematian. Menurut penelitian oleh Yanagihara *et al* pada tahun 2016, pada spesies *Alatina alata* didapatkan bahwa uji toksisitas racun dapat dinilai dengan metode hemolisis eritrosit. Berdasarkan uraian tersebut, peneliti ingin mengetahui toksisitas racun pada spesies yang berbeda yaitu *Physalia utriculus* dengan menggunakan metode yang sama yaitu hemolisis eritrosit. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui toksisitas pada racun *Physalia utriculus* dari perairan Papuma

Jember terhadap eritrosit secara *in vitro*. Manfaat penelitian ini dapat memberikan tambahan informasi mengenai sifat toksin pada *Physalia utriculus* dari perairan Papuma Jember dan memberikan sumbangan pengembangan terhadap Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Kedokteran khususnya dibidang toksikologi dan farmakologi yang dapat digunakan sebagai dasar dalam penelitian lebih lanjut.

Jenis penelitian ini adalah *true experimental* dan menggunakan desain *randomized posttest only control group design* yang terdiri atas satu kelompok kontrol negatif, satu kelompok kontrol positif, dan enam kelompok perlakuan. Populasi pada penelitian ini adalah media *venom blood agarose* yang dibuat dari darah manusia dengan golongan darah O berusia 21 tahun. Jumlah sampel yang digunakan sebanyak 32 sampel yang dihitung berdasarkan rumus Federer. Variable bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi toksin *Physalia utriculus* yang dibagi menjadi 6 konsentrasi yang berbeda, yaitu 1 mg/ml, 5 mg/ml, 15 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, dan 100 mg/ml. Variabel terikat dari penelitian ini yaitu luas area lisis yang berada pada *venom blood agarose*. Variabel terkontrol dalam penelitian ini yaitu jenis toksin *Physalia utriculus*, suhu, waktu inkubasi, *venom blood agarose*, ringer laktat, dan triton X-100.

Pembuatan konsentrasi toksin *Physalia utriculus* dengan cara mengisolasi racun dari *nematocyst* yang berada di tentakel ubur-ubur melalui metode autolisis, yang kemudian dikristalkan dan di encerkan sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan. Lama penelitian ini yaitu 3 hari yaitu dimulai dengan pembuatan toksin *Physalia utriculus* dan pembuatan media *venom blood agarose*. Pada perlakuan tiap kelompok, kelompok perlakuan diberikan racun *Physalia utriculus* dengan konsentrasi yang berbeda-beda, berupa kelompok perlakuan 1 diberikan konsentrasi 1 mg/ml, kelompok perlakuan 2 diberikan konsentrasi 5 mg/ml, kelompok perlakuan 3 diberikan konsentrasi 15 mg/ml, kelompok perlakuan 4 diberikan konsentrasi 25 mg/ml, kelompok perlakuan 5 diberikan konsentrasi 50 mg/ml, dan kelompok perlakuan 6 diberikan konsentrasi 100 mg/ml, sedangkan untuk kelompok kontrol negatif diberikan *ringer laktat* dan untuk kelompok kontrol positif diberikan triton X-100. Pemberian perlakuan pada tiap kelompok dilakukan dalam sekali pemberian.

Pengamatan dilakukan dengan menghitung luas area lisis yang dihasilkan dengan cara memfoto hasil dari penelitian tersebut dan kemudian hasil foto dimasukkan dalam

aplikasi *Image J* untuk menghitung luas area lisis. Data tersebut kemudian dianalisis dengan uji normalitas dan uji homogenitas, serta uji beda dengan uji *One Way ANOVA* yang dilanjutkan dengan uji *post hoc Tamhane's*.

Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa racun *Physalia utriculus* dari perairan Papuma Jember dapat menyebabkan lisis pada eritrosit. Uji *One Way ANOVA* menunjukkan hasil yang signifikan berbeda dengan $p = 0,000$. Uji *post hoc Tamhane's* menunjukkan bahwa racun *Physalia utriculus* pada konsentrasi 1 mg/ml dan 5 mg/ml tidak bersifat toksik terhadap eritrosit karena tidak terdapat perbedaan dengan kelompok negatif. Sedangkan pada kelompok perlakuan ketiga, keempat, kelima, dan keenam terhadap kelompok kontrol negatif memiliki hasil yang signifikan ($p_3 = 0,015$, $p_4 = 0,000$, $p_5 = 0,003$, $p_6 = 0,000$), sehingga membuktikan bahwa racun *Physalia utriculus* pada konsentrasi 15 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, dan 100 mg/ml bersifat toksik terhadap eritrosit. Uji *post hoc Tamhane's* pada kontrol positif dengan perlakuan keenam memiliki hasil yang tidak signifikan ($p = 0,747$), sehingga menunjukkan bahwa racun *Physalia utriculus* pada konsentrasi 100 mg/ml memiliki daya lisis yang kuat, dimana hampir menyamai lisis 100% menggunakan triton X-100.

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi berjudul “Toksistas Racun *Physalia utriculus* dari Perairan Papuma Jember Terhadap Eritrosit Secara *In Vitro*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat pendidikan strata satu di Fakultas Kedokteran.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. dr. Supangat, M. Kes., Ph. D., Sp. BA selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan selama menempuh pendidikan kedokteran di Universitas Jember;
2. dr. Dini Agustina, M. Biomed selaku Dosen Pembimbing Akademik serta Dosen Pembimbing Anggota yang telah membimbing saya selama menempuh pendidikan kedokteran di Universitas Jember;
3. dr. Al Munawir, M. Kes., Ph. D selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga, dan perhatian dalam penulisan skripsi ini;
4. dr. Rini Riyanti, Sp. PK selaku Dosen Penguji I dan dr. Ayu Munawaroh Aziz, M. Biomed selaku Dosen Penguji II atas segala saran dan masukan yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
5. Orangtua tercinta Ayah Wijono Gutomo dan Ibu Lailatun Nikmah yang tidak pernah lelah memberikan doa, dukungan, bimbingan, kasih sayang, serta pengorbanan selama ini;
6. Saudaraku tercinta, kakak Hendrik Agus Prasetyo dan Naning Sakti Andriyani serta Adik Endah Hidayatul Fuadiah dan Rafif Imam Wasis Abdillah yang selalu memberikan doa, dukungan, dan kasih sayang;
7. Sahabat saya, Friscasari Febriani Gurusinga yang selalu memberikan motivasi, dukungan, do'a dan bantuan selama ini;
8. Sahabat semasa kuliah hingga nanti menua, Tralala tercinta, Nanda, Nely, Nurul, Nisa, Novera, Lusi, dan Novail yang telah berjuang bersama dikala sedih, susah, dan senang, selama menempuh pendidikan di perkuliahan ini;

9. Adik-adik yang telah membantu saya dalam mengerjakan penelitian ini Wendah, Adin, dan Naneer;
10. Teman-teman yang telah membantu saya dalam menyelesaikan skripsi ini Nunung, Afil, Nanda, Tata, Nastiti, Bela, Novera, Antia dan Mardiah;
11. Seluruh teman-teman ELIXIR yang telah berjuang bersama dari masa PK2 hingga nanti lulus dan menjadi dokter bersama;
12. Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu, terima kasih atas segala bantuan dan kerjasamanya.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya, penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, Oktober 2018

Penulis

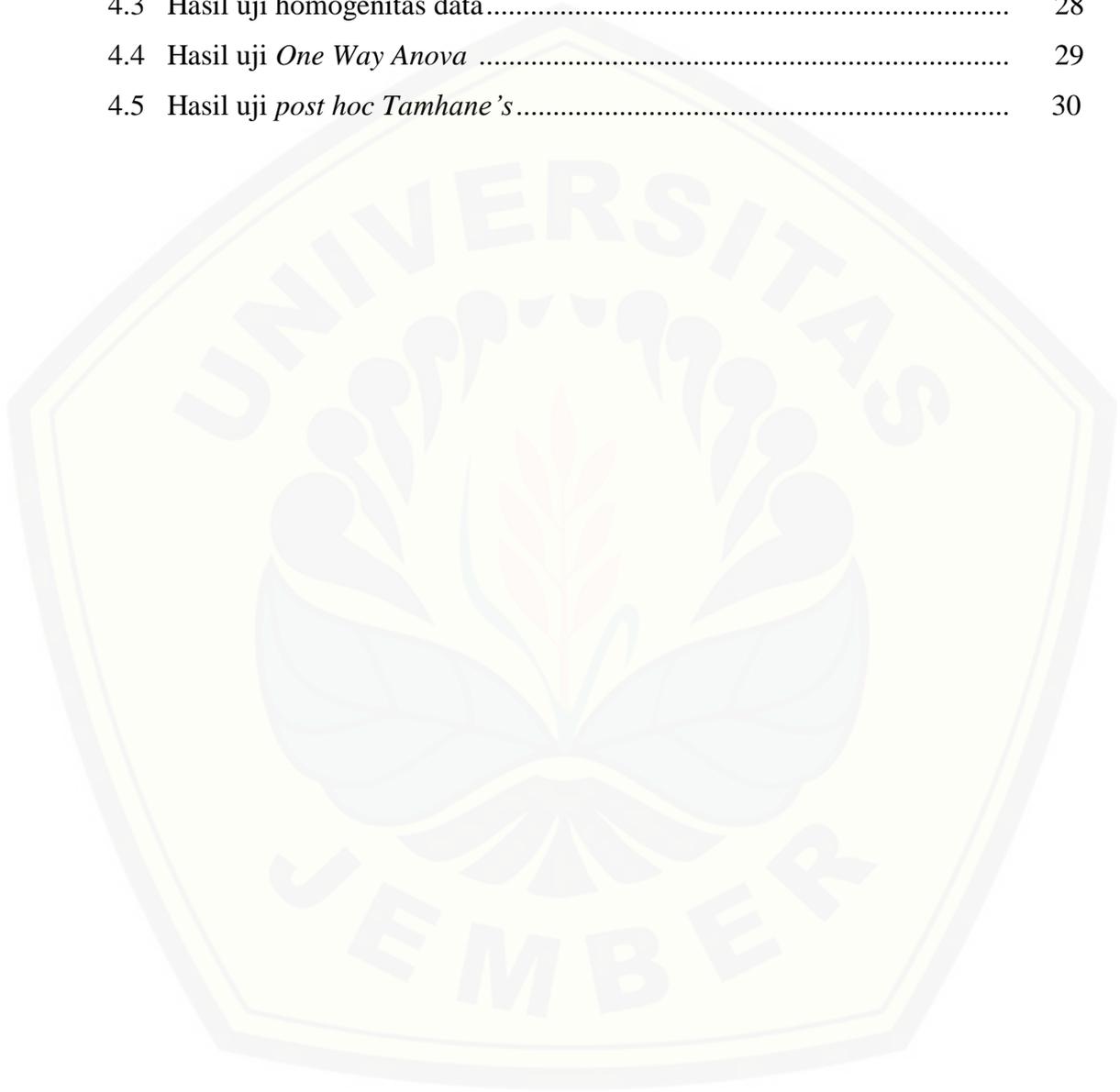
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN BIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	xi
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 <i>Physalia utriculus</i>	5
2.1.1 Taksonomi dan Morfologi	5
2.1.2 Mekanisme Sengatan <i>Physalia utriculus</i>	7
2.1.3 Efek dan Kandungan Racun Ubur-Ubur (<i>Physalia utriculus</i>).....	8
2.2 Toksisitas	10
2.3 Eritrosit	11
2.3.1 Eritrosit	11
2.3.2 Hemolisis Eritrosit	13
2.4 Kerangka Konseptual Penelitian	14
2.5 Hipotesis Penelitian	14
BAB 3. METODE PENELITIAN	15
3.1 Jenis Penelitian	15
3.2 Rancangan Penelitian	15
3.3 Populasi dan Sampel Penelitian	16
3.2.1 Populasi Penelitian	16
3.2.2 Sampel Penelitian	17
3.4 Tempat dan Waktu Penelitian	17
3.5 Variabel Penelitian	17

3.5.1 Variabel Bebas.....	17
3.5.2 Variabel Terikat.....	18
3.5.3 Variabel Terkendali.....	18
3.6 Definisi Operasional	18
3.6.1 Konsentrasi Racun Ubur-ubur.....	18
3.6.2 Luas Area Hemolisis.....	18
3.6.3 Aplikasi <i>Image J</i>	19
3.7 Alat dan Bahan Penelitian	19
3.7.1 Alat Penelitian.....	19
3.7.2 Bahan Penelitian.....	19
3.8 Prosedur Penelitian	19
3.8.1 Uji Kelayakan Etik.....	19
3.8.2 Persiapan Ubur-ubur (<i>Physalia utriculus</i>).....	19
3.8.3 Proses Isolasi Racun <i>Physalia utriculus</i>	20
3.8.4 Persiapan Media <i>Venom Blood Agarose</i>	20
3.8.5 Induksi dan Pengamatan Racun <i>Physalia utriculus</i> pada <i>Venom Blood Agarose</i>	21
3.9 Analisis Data	22
3.10 Alur Penelitian	22
3.10.1 Pengisolasian Racun Ubur-Ubur <i>Physalia utriculus</i>	22
3.10.2 Persiapan Media <i>Venom blood agarose</i>	23
3.10.3 Perlakuan pada Tiap Kelompok.....	24
3.10.4 Penilaian Toksisitas Racun <i>Physalia utriculus</i> Pada <i>Venom</i> <i>Blood Agarose</i>	25
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	26
4.1 Hasil Penelitian	26
4.1.1. Data Hasil Penelitian.....	26
4.1.2. Hasil Analisis Statistik.....	27
a. Uji Normalitas dan Homogenitas.....	28
b. Uji Hipotesis <i>One Way Anova</i>	29
a. Uji <i>Post hoc</i>	29
4.2 Pembahasan	31
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	34
5.1 Kesimpulan	34
3.2 Saran	34
DAFTAR PUSTAKA	35
LAMPIRAN	39

DAFTAR TABEL

	Halaman
4.1 Hasil luas area lisis pada media <i>venom blood agarose</i>	27
4.2 Hasil uji normalitas data	28
4.3 Hasil uji homogenitas data.....	28
4.4 Hasil uji <i>One Way Anova</i>	29
4.5 Hasil uji <i>post hoc Tamhane's</i>	30



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 <i>Physalia utriculus</i>	5
2.2 <i>Pneumatophore Physalia sp</i>	6
2.3 <i>Dactylozoid, gonozoid, dan gastrozoid Physalia sp</i>	6
2.4 Sengatan <i>Physalia utriculus</i>	9
2.5 Eritrosit normal	12
2.6 Hemolisis eritrosit pada media <i>blood agar plate</i>	13
2.7 Skema kerangka konsep.....	14
3.1 Skema rancangan penelitian.....	16
3.2 Skema Pengisolasian Racun <i>Physalia utriculus</i>	22
3.3 Skema Persiapan Media Venom blood agarose	23
3.4 Skema Perlakuan.....	24
3.5 Skema Penilaian Toksisitas Racun <i>Physalia utriculus</i> Pada <i>Venom Blood Agarose</i>	25
4.1 Hasil luas area lisis pada media <i>venom blood agarose</i> yang diambil dari jarak 5 cm terhadap media dengan waktu 20 jam setelah perlakuan	26

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Persetujuan Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember....	39
Lampiran 2 <i>Informed Consent</i>	40
Lampiran 3 Lembar Penjelasan Untuk Subjek Penelitian.....	41
Lampiran 4 Prosedur Penelitian	42
Lampiran 5 Hasil Perlakuan pada Media <i>Venom Blood Agarose</i>	44
Lampiran 6 Pengukuran Luas Area Lisis Menggunakan <i>Image J</i>	45
Lampiran 7 Hasil Pengukuran Luas Area Lisis	47
Lampiran 8 Analisis Menggunakan SPSS	48
Lampiran 9 Dokumentasi Penelitian	51

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia adalah negara kepulauan yang terdiri dari sekitar 17.000 pulau dengan ukuran bervariasi dan mempunyai asal-usul geologi yang kompleks seperti dalam komposisi tumbuhan dan hewannya. Indonesia, sebagai salah satu pusat keanekaragaman yang terbesar di dunia, baik dari segi kekayaan alam, jenisnya, maupun dari segi tingkat endemisitasnya (Iskandar dan Erdelen, 2006). Beberapa kekayaan alam Indonesia adalah alam bawah laut yang kaya akan biota bawah laut baik flora maupun faunanya, dan salah satunya adalah ubur-ubur (Nontji, 2008).

Ubur-ubur dapat bermanfaat bagi manusia dan dapat pula merugikan manusia. Secara Internasional, telah banyak kasus yang dilaporkan yang berkaitan dengan sengatan ubur-ubur. Di Sao Paulo, Brazil pada awal musim panas tahun 2008 dilaporkan selama 4 hari terdapat 331 pasien tersengat ubur-ubur. Semua pasien memiliki tanda-tanda fisik lokal yang sama: plak eritematosa linier dengan panjang bervariasi (rata-rata 18 cm) yang sangat menyakitkan. Lesi kulit menunjukkan suatu karakteristik pola seperti-rosario, mengikuti tentakel yang tersusun atau tersegmentasi dan mencerminkan bentuk nematokista. Lesi pada anggota tubuh bagian atas terjadi pada 38% pasien, dan 16,3% pasien memiliki lesi di tangan mereka. Lesi anggota tubuh bagian bawah terdapat pada 27,1% pasien. Lesi pada dada terdapat pada 24,4% pasien, perut pada 7,2% pasien dan kepala pada 2,7% pasien. Beberapa pasien memiliki lesi pada lebih dari satu segmen, yaitu 19% pasien memiliki beberapa segmen yang terpengaruh dan 13,6% memiliki plak linear di dada dan tangan. Keringat dingin adalah manifestasi sistemik yang paling umum pada 16,3% pasien, diikuti oleh mual dan muntah pada 9,9% pasien dan takikardia pada 7,2% pasien, sedangkan nyeri dada dan hipertensi masing-masing terjadi pada 0,9% pasien. Sebelum dilakukan tindakan pertolongan pertama, seluruh pasien mengeluhkan nyeri yang sangat parah, dari 279 pasien yang dirawat dengan air laut dingin dan cuka, 247 pasien mengalami pengurangan nyeri yang signifikan dalam 3 jam, tetapi pada 16 pasien

masih memiliki rasa sakit yang signifikan. Dua tahun setelah kejadian tersebut dilaporkan terdapat 16 pasien yang memiliki pigmentasi lokal yang persisten dan 3 pasien diantaranya memiliki nyeri kronis lokal dan pruritus yang bertahan selama berbulan-bulan (Junior *et al.*, 2013). Diperkirakan jumlah sengatan ubur-ubur pertahunnya yang dilaporkan ada 150 juta kasus, dengan beberapa wilayah Pasifik melaporkan hingga 800 kejadian perharinya hanya pada satu pantai (Thomas *et al.*, 2001; Bernardo, 2004).

Di Indonesia, kasus yang telah dilaporkan antara tahun 2005 sampai 2009 terdapat 13 kasus, yang berada pada Sanur Beach (Bali), Depok Beach (Bantul), Teleng Ria beach (Pacitan), Parangtritis beach (Bantul), Mlandingan (Situbondo), Banyuputih (Situbondo), Bambang beach (Jebus), Parangtritis and Samas beach (Bantul), Parangtritis beach (Bantul), Widrapayung beach (Cilacap), Glagah Indah and Trisik beach (Kulonprogo), Kukup beach (Gunung Kidul), dan Pangandaran beach (Ciamis). Dari 13 kasus tersebut, 3 kasus diantaranya menyebabkan korban meninggal dunia, 2 korban meninggal di Situbondo, dan 1 korban meninggal di Jebus. Kecelakaan terjadi antara bulan Juni hingga Oktober ketika musim kemarau, jumlah korban bervariasi dari satu orang hingga ratusan, dampak sengatan ubur-ubur juga bervariasi dari hanya merasa gatal dan terbakar pada kulit hingga kematian. Dilihat dari deskripsi hewan oleh penduduk setempat dan efek yang disebabkan oleh sengatan, itu merujuk pada *Physalia utriculus* dan *Physalis physalis*. Dua kasus yang terjadi di Situbondo dilaporkan pada bulan Juni dan Juli 2008. Kedua kasus tersebut menyebabkan korban usia 19 tahun dan 10 tahun meninggal, kedua korban disengat ketika mereka berenang di dekat pantai. Tubuh, punggung, perut, dan kaki mereka didapati lesi kemerahan. Ketika mereka dievakuasi, tubuh mereka kejang terus-menerus dan keluar cairan seperti busa dari mulut mereka. Akhirnya, mereka meninggal selama evakuasi ke fasilitas kesehatan setempat. Kasus lain yang terjadi di Jebus juga dilaporkan pada Oktober 2008 menyebabkan seorang anak usia 4 tahun meninggal dunia. Dia bermain di pantai bersama kakak laki-lakinya ketika tiba-tiba disengat ubur-ubur di kakinya. Segera, dia menjadi tidak sadar, kaki dan genitalnya didapati lesi kemerahan. Saat evakuasi menuju fasilitas kesehatan, lesi pada kakinya berubah

menjadi kebiru-biruan. Anak usia 4 tahun tersebut meninggal saat evakuasi ke fasilitas kesehatan setempat, sedangkan saudaranya selamat (Mujiono, 2010).

Dua spesies yang sering ditemukan dan menyebabkan kasus sengatan ubur-ubur adalah *Physalia physalis* atau yang sering disebut *Portuguese man-of-war* dan *Physalia utriculus* atau *Blue bottle*. Sengatan dari *Physalia utriculus* dapat menyebabkan tidak sadarkan diri, tidak terabanya denyut nadi, dan dilatasi pupil yang abnormal. Disamping efek tersebut, racun dari *Physalia utriculus* juga dapat menyebabkan hipersensitivitas langsung yang berupa urtikaria, edema, dan bronkospasme (Tibballs *et al.*, 2011). Adanya kontak antara kulit dengan nematokista dari ubur-ubur akan menyerupai sebuah tusukan, dan peradangan berkelanjutan. Selain itu iritasi pada saraf menghasilkan rasa sakit, pembengkakan dan gatal, yang berpotensi menyebabkan nekrosis kulit pada sengatan yang lebih parah. Efek lokal dari racun tersebut terjadi karena penetrasi benang dan aktivitas berbagai senyawa, seperti fosfolipase A2 serta eksositosis dari granula sel. Nematokista juga dapat menyebabkan gejala sistemik potensial sebagai akibat dari racun yang memasuki sirkulasi tubuh termasuk pada gastrointestinal, otot, jantung, dan neurologis. Toksin ubur-ubur dilaporkan juga termasuk fraksi hemolitik dan mematikan. Fraksi mematikan mungkin mengandung neurotoksin dan kardiotoxin, yang menyebabkan aritmia ventrikel dan serangan jantung (Cegolon *et al.*, 2013).

Menurut uraian diatas didapatkan bahwa racun dari *Physalia utriculus* dapat menyebabkan beberapa masalah pada tubuh, baik lokal maupun sistemik seperti hemolisis eritrosit, degranulasi sel, nekrosis dermis, aglutinasi platelet, kontraksi otot pembuluh darah, dan sebagainya. Bahkan untuk kasus-kasus fatal dapat menyebabkan kematian. Menurut penelitian oleh Yanagihara *et al* pada tahun 2016, pada spesies *Alatina alata* didapatkan bahwa uji toksisitas racun dapat dinilai dengan metode hemolisis eritrosit. Berdasarkan uraian diatas, peneliti ingin mengetahui toksisitas racun pada spesies yang berbeda yaitu *Physalia utriculus* dengan menggunakan metode yang sama yaitu hemolisis eritrosit.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian diatas, maka permasalahan yang muncul adalah bagaimana toksisitas racun *Physalia utriculus* dari perairan Papuma Jember terhadap eritrosit secara *in vitro*?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah di atas tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui toksisitas pada racun *Physalia utriculus* dari perairan Papuma Jember terhadap eritrosit secara *in vitro*.

1.4 Manfaat Penelitian

Beberapa manfaat dari penelitian ini yaitu:

a. Bagi peneliti

Peneliti dapat menambah wawasan dan pengetahuan dengan penelitian ini mengenai sifat toksin pada racun *Physalia utriculus* dari perairan Papuma Jember.

b. Bagi institusi

Hasil penelitian ini diharapkan dapat mendukung tercapainya visi misi Fakultas Kedokteran Universitas Jember yaitu menjadi lembaga pendidikan yang unggul dalam bidang Agromedis.

c. Bagi Perkembangan IPTEK

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan tambahan informasi mengenai sifat toksin pada *Physalia utriculus* dari perairan Papuma Jember dan memberikan sumbangan pengembangan terhadap Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Kedokteran khususnya dibidang toksikologi dan farmakologi yang dapat digunakan sebagai dasar dalam penelitian lebih lanjut.

d. Bagi masyarakat

Penelitian ini dapat memberikan wawasan dan pengetahuan bagi masyarakat mengenai bahaya dari racun *Physalia utriculus*.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Physalia utriculus*

Ubur-ubur merupakan anggota dari *phylum Cnidaria (Coelenterata)*, yang sampai saat ini, telah ditemukan lebih dari 10.000 spesies, 100 diantaranya dapat meracuni manusia (Hornbeak dan Auerbach, 2017). Salah satu jenis ubur-ubur beracun yang sering ditemukan yaitu *Physalia spp* (Bateman *et al.*, 2014).

2.1.1 Taksonomi dan Morfologi

Physalia utriculus atau biasa disebut *blue bottle* yang termasuk dalam kelas *Hydrozoa* yang sering disalah artikan sebagai *jellyfish* sebenarnya melainkan sebuah *Siphonophora* (Bais *et al.*, 2017) seperti pada Gambar 2.1

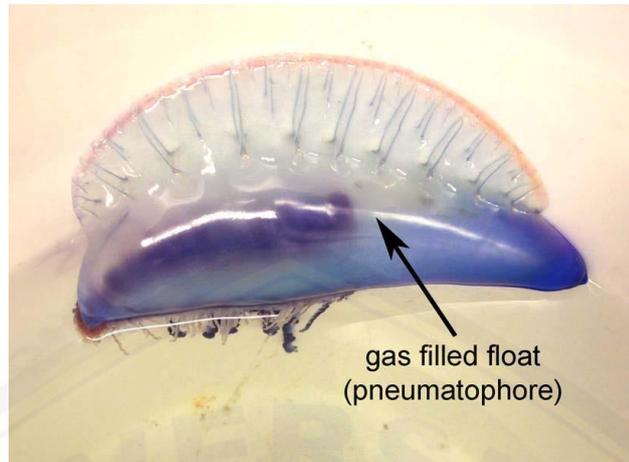
Physalia utriculus

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Cnidaria
Kelas	: Hydrozoa
Famili	: Phisaliidae
Genus	: <i>Physalia</i>
Spesies	: <i>Physalia utriculus</i>

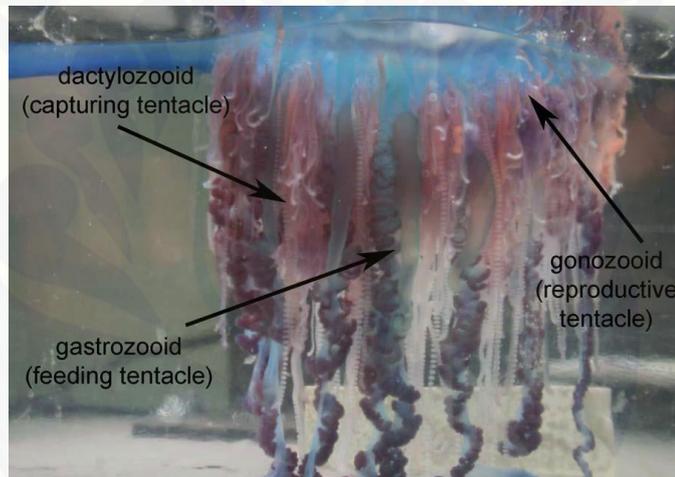
(Schuchert, 2018).



Gambar 2.1 *Physalia utriculus* (Global Biodiversity Information Facility, 2017)



Gambar 2.2 *Pneumatophore Physalia sp.* (King, 2003)



Gambar 2.3 *dactylozoid, gonozoid, dan gastrozoid Physalia sp.* (King, 2003)

Physalia utriculus hidup dengan cara mengapung di atas permukaan air laut dan memiliki warna biru transparan, merah muda atau keunguan dengan banyak tentakel. Tubuh *Physalia utriculus* ini tersusun dari sebuah medusa yang disebut dengan *pneumatophore*, dan tiga polip yaitu *dactylozoid*, *gonozoid*, dan *gastrozoid* (Kurlansky, 2002) yang dapat dilihat pada Gambar 2.2 dan Gambar 2.3. *Pneumatophore* merupakan bagian dari *Physalia utriculus* yang terlihat pada permukaan laut karena bagian tersebut terisi udara untuk mengapung, *pneumatophore* memiliki warna translusen dengan sedikit berwarna biru atau ungu. Fungsi *pneumatophore* juga memungkinkan ubur-ubur untuk bersandar horizontal saat angin berhembus, berlayar dengan hembusan angin, dan terbawa

oleh arus air (Cegolon *et al.*, 2013). *Dactylozoid* merupakan tentakel yang berbentuk umbai panjang yang digunakan sebagai pertahanan diri dan menangkap mangsa. *Gonozoid* merupakan tentakel yang digunakan untuk bereproduksi. *Gastrizoid* merupakan tentakel yang digunakan untuk mencerna makanan (King, 2003). *Physalia utriculus* mempunyai tentakel utama yang banyak yakni kurang lebih 7-8 tentakel dan beberapa tentakel pendek lainnya. Tentakel *Physalia utriculus* panjang rata-ratanya mencapai 10 m dan ada yang mencapai 30 m dibawah permukaan air laut (Yanagihara *et al.*, 2002). *Physalia utriculus* dapat ditemukan di daerah Indo-Pasifik, Laut India dan Atlantis Selatan. *Physalia utriculus* lebih sering ditemukan di perairan yang panas dan beriklim sedang. Namun, ubur-ubur ini kadang-kadang dapat pula ditemukan di perairan Atlantik yang dingin, seperti di Perancis Utara, Belgia, dan Inggris bagian Baratdaya (Cegolon *et al.*, 2013).

2.1.2 Mekanisme Sengatan (*Physalia utriculus*)

Tentakel pada ubur-ubur dilapisi oleh deretan alat penyengat khusus yang disebut *nematocyst*. *Nematocyst* sendiri berada dalam suatu struktur yang disebut *cnidoblast* yang merupakan kapsul-kapsul terbuat dari *collagen-like* protein sehingga terbentuk dinding kuat namun mudah untuk ditembus ketika *nematocyst* keluar untuk menusuk mangsa (Oppegard *et al.*, 2009). *Cnidoblast* berupa rongga yang berisi suatu bentukan benang yang melingkar-lingkar dengan duri di permukaannya, dan di dalam *cnidoblast* terdapat titik picu yang dapat dirangsang oleh stimulus mekanik maupun kimia. Jika terdapat stimulus yang mengenai titik picu, maka benang melingkar-lingkar yang mengandung racun dapat ditembakkan. (Bateman, *et al.*, 2014; Whitaker *et al.*, 2014).

Ketika terdapat rangsangan baik mekanik maupun kimia yang mengenai titik stimulasi di *cnidoblast*, akan terbentuk sinyal untuk membuka penutup *nematocyst* dan mengeluarkan racun. Proses ini menggunakan tekanan internal yang sangat tinggi sehingga dapat menyebabkan injeksi dalam waktu singkat, dimana *nematocyst* mampu melakukan penetrasi dengan kecepatan diatas 15 m/detik dengan kedalaman mencapai 0,9 mm. (Whitaker *et al.*, 2014). Racun yang

masuk ke dalam mikrovaskuler dermis akan diabsorpsi ke dalam sirkulasi sistemik. Racun menyebar keseluruh tubuh mangsa secara hematogen. Setelah terjadi pelepasan *nematocyst* akan diikuti pelepasan racun ke dalam integumen mangsa (Oppegard *et al.*, 2009).

2.1.3 Efek dan Kandungan Racun Ubur-Ubur (*Physalia utriculus*)

Potensi suatu ubur-ubur dalam menyebabkan luka digolongkan menjadi tiga golongan atau *grade*, *grade 1* yaitu golongan yang mematikan, *grade 2* yaitu golongan sedang, dan *grade 3* yaitu tidak berbahaya (Mujiono, 2010). Toksin dari *Physalia utriculus* ini berbahaya bagi tubuh manusia, bahkan menurut Mujiono (2010), *Physalia utriculus* masuk dalam *grade 2* atau sedang.

Racun dari *Physalia utriculus* merupakan sebuah cairan lipofilik yang mengandung polipeptida dengan konsentrasi kental yang mana dapat menimbulkan neurotoksik dan reaksi kulit yang cukup parah pada manusia. Racun ini masuk kedalam tubuh melalui proses difusi (Junior *et al.*, 2013). Racun *Physalia utriculus* mengandung beberapa enzim dan protein, yaitu hemolisin, non spsifik amino peptidase, ATPase, Dnase, Rnase, *ammonium*, *histamine*, *5-hydroxytrip-tamin*, *glutamic acid*, *histamine releasers*, *hyaluronidase*, *cathecolaminers*, *cardiotoxin*, *kinins*, *phospolipase*, dan *dermatonecrotic* (Lane dan Dodge, 1960; Alam dan Qasim, 1991; Chung *et al.*, 2001). Racun dari *Physalia utriculus* juga diketahui mengandung protein hemolitik yang berupa *physalitoxin* dan protein sitolitik yang berupa PuTX-IVC (Edward dan Hessinger, 2000; Alam *et al.*, 2006). Racun ini dapat mengacaukan membrane sel, menyebabkan pelepasan media inflamasi, abnormalitas transport ion Ca, dan bekerja secara langsung sebagai racun pada miokardium, hepar, ginjal, dan jaringan saraf (Larasati, 2015). Sengatan *Physalia utriculus* menyebabkan edema, urtikaria, parastesia, *dypsneu*, shock, kelemahan otot, gangguan jantung dan paru, hingga kematian (Chung *et al.*, 2001; Hoover, 2004).

Saat mengapung di permukaan laut, terutama saat *Physalia utriculus* bergerombol, *Physalia utriculus* merupakan bahaya bagi perenang maupun nelayan, bahkan *Physalia utriculus* yang terdampar dipantai masih mampu menyengat jika terkena bagian tubuh, meskipun setelah beberapa hari mengalami dehidrasi. Sengatan fisik biasanya multipel, dan selalu menyebabkan gejala lokal dengan rasa sakit, lesi biasanya berbentuk linier, dengan panjang lebih dari 20 cm dengan edema intradermal di daerah yang mengalami kontak dengan tentakel dari *Physalia utriculus* seperti pada Gambar 2.4. Beberapa luka kulit yang parah dapat menjadi nekrotik dalam waktu 24 jam dan berkembang menjadi keropeng yang dapat berlangsung selama sekitar 2 minggu sebelum mengering. Setelah lesi sengatan sembuh akan menjadi bekas luka eritematosa yang dapat bertahan lama. Lesi kulit dari sengatan *Physalia utriculus* sangat mudah dikenali, dengan nematokis bulat yang khas yang terdeteksi di kulit yang mengalami lesi (Cegolon *et al.*, 2013).



Gambar 2.4 Sengatan *Physalia utriculus*. Kiri atas: sengatan setelah 2 jam pada dorsum pasien. Kanan atas: sengatan setelah 12 jam di dada lateral. Kiri bawah: sengatan setelah 12 jam di punggung. Kanan bawah: sengatan setelah 24 jam di pergelangan tangan. (Junior *et al.*, 2013)

2.2 Toksisitas

Toksisitas adalah kemampuan dari suatu zat kimia dalam menyebabkan suatu kerusakan pada organisme baik saat digunakan atau saat berada dalam lingkungan. Dan secara umum toksisitas dibagi menjadi toksisitas akut, toksisitas subakut dan toksisitas kronik (Priyanto, 2009). Berdasarkan Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia nomor 7 tahun 2014, uji toksisitas adalah suatu uji untuk mendeteksi efek toksik suatu zat pada sistem biologi dan untuk memperoleh data dosis-respon yang khas dari sediaan uji. Data yang diperoleh dapat digunakan untuk memberi informasi mengenai derajat bahaya sediaan uji tersebut bila terjadi pemaparan pada manusia, sehingga dapat ditentukan dosis penggunaannya demi keamanan manusia.

Toksisitas dapat dievaluasi pada seluruh organisme (*in vivo*) atau menggunakan molekul atau sel (*in vitro*). Keuntungan utama pengujian toksisitas ialah mendeteksi senyawa beracun berdasarkan aktivitas biologisnya, dan karena itu tidak memerlukan pengetahuan apriori dari racun untuk mengidentifikasi keberadaannya (tidak seperti analisis kimia). Karakteristik yang sama juga merugikan, karena walaupun pengujian toksisitas dapat menentukan apakah senyawa beracun atau tidak, hal itu tidak mengidentifikasi racun tersebut (Enhealth, 2012).

Uji toksisitas secara langsung dapat dilakukan dengan *in vivo bioassay* dan *in vitro bioassay*. Uji toksisitas konvensional bergantung pada penilaian toksisitas langsung pada seluruh organisme (Blaise dan Ferard, 2005). Organisme yang terpapar dengan bahan kimia atau campuran akan dimonitor untuk tanda-tanda efek kesehatan yang merugikan. Ini bisa berupa efek morfologi (seperti penurunan berat badan, lesi, kematian) atau efek biokimiawi, yang merupakan biomarker paparan (indikator dosis internal, seperti metabolit dalam air seni) atau biomarker efek (indikator efek kesehatan, seperti aktivitas enzim). Durasi paparan tergantung pada jenis toksisitas yang terdeteksi atau dipantau, dari efek akut jangka pendek (96 jam atau kurang), sub akut (beberapa hari), sub-kronis (beberapa minggu) sampai dengan efek kronis (sebagian besar harapan hidup organisme). Bergantung pada spesies yang digunakan, pengujian inisial *in vivo* umumnya dipandang

sebagai prediktor efek kesehatan manusia yang paling relevan. Hal ini karena tes *in vivo* meliputi penilaian absorpsi, distribusi, metabolisme dan ekskresi, dan hal-hal yang bisa memodulasi toksisitas sampel (Enhealth, 2012).

Pada uji toksisitas *bioassay in vitro*, molekul (misalnya enzim) atau sel utuh terpapar bahan kimia atau campuran akan diamati dan dipantau untuk efek spesifik. Toksisitas *in vitro* terjadi pada dosis yang jauh lebih rendah dari pada efek pada uji toksisitas secara *in vivo*, tetapi hal ini juga berarti bahwa zat dapat bersifat toksik secara *in vitro* namun tidak secara *in vivo*. Berbagai efek toksik dapat dipantau secara *in vitro*, mulai dari toksisitas basal (sitotoksitas) dan toksisitas reaktif (interaksi dengan protein atau DNA, yang kemudian dapat menyebabkan karsinogenisitas) yang berpotensi mempengaruhi semua sel, terhadap toksisitas spesifik yang hanya dapat mempengaruhi sel tertentu atau organ misalnya efek endokrin, neurotoksisitas, *imunotoxicity*, toksisitas hati, dan lain-lain. Biasanya, uji *in vitro* dilakukan pada jenis sel tertentu tergantung pada minat peneliti. Uji *in vitro* umumnya merupakan uji cepat jangka pendek (<1 minggu) yang memberikan pengukuran cepat potensi toksisitas pada skala kecil (Enhealth, 2012).

2.3 Eritrosit

2.3.1 Eritrosit

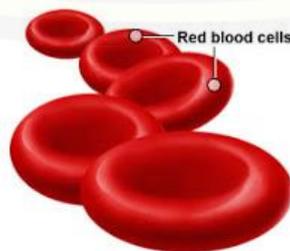
Eritrosit adalah sel tidak berinti yang mengandung hemoglobin yang berfungsi untuk transport oksigen dalam darah. Nilai normal eritrosit pada pria dewasa adalah 4,5-6,5 jt/mm³ dan pada wanita dewasa 3,8-4,8 jt/mm³ (Riswanto, 2013). Eritrosit berbentuk cakram bikonkaf dengan diameter 8 µm, dengan tebal bagian tepi luar 2 µm tebal, dan tebal bagian tengahnya 1 µm seperti pada Gambar 2.5. Bentuk ini memberikan kontribusi dalam dua hal untuk efisiensi sel darah merah dalam melakukan fungsi utamanya yaitu pengangkutan oksigen kedalam darah: (1) Bentuk bikonkaf memberikan area permukaan yang lebih luas untuk membagi oksigen melintasi membran daripada sel dengan bentuk bola dengan volume yang sama. (2) Ketipisan sel memungkinkan oksigen untuk

menyebarkan dengan cepat di antara daerah eksterior dan interior sel (Sherwood, 2012).

Keunikan lain dari struktur eritrosit adalah fleksibilitas membran tersebut yang tinggi. Eritrosit, yang diameternya biasanya 8 μm , dapat berubah bentuk saat mereka melalui kapiler-kapiler kecil dengan diameter 3 μm . Karena membran tersebut sangat fleksibel, eritrosit dapat melakukan perjalanan melalui kapiler yang sempit dan berliku-liku untuk mengantarkan oksigen yang mereka bawa ke jaringan-jaringan tujuan tanpa mengalami ruptur dalam prosesnya (Sherwood, 2012).

Ciri anatomi lain yang paling penting yang memungkinkan eritrosit untuk mengangkut oksigen ialah hemoglobin yang ada didalamnya. Hemoglobin hanya ditemukan pada sel eritrosit. Karena kandungan besi yang ada pada hemoglobin mengakibatkan hemoglobin tampak merah ketika berikatan dengan oksigen dan akan tampak keunguan ketika mengalami deoksigenasi. Oleh sebab itu, darah arteri yang teroksigenasi penuh akan tampak berwarna merah segar dan darah pada vena yang telah kehilangan sebagian oksigennya karena telah dikirimkan pada jaringan-jaringan akan tampak keunguan (Sherwood, 2012).

Pada keadaan normal, 97% oksigen yang dibawa dari paru-paru menuju jaringan, diangkut dalam bentuk campuran kimiawi antara oksigen dengan hemoglobin di dalam eritrosit, sedangkan 3% sisanya diangkut dalam bentuk terlarut pada cairan plasma dan sel darah. Dengan demikian, hampir seluruh oksigen yang dibawa menuju jaringan dibantu dengan hemoglobin. Faktor-faktor yang dapat menurunkan fungsi oksigenasi adalah volume darah yang rendah, anemia, hemoglobin rendah, aliran darah yang kurang, dan adanya penyakit paru (Guyton, 2014).



Gambar 2.5 Eritrosit normal (Lorenza, 2016)

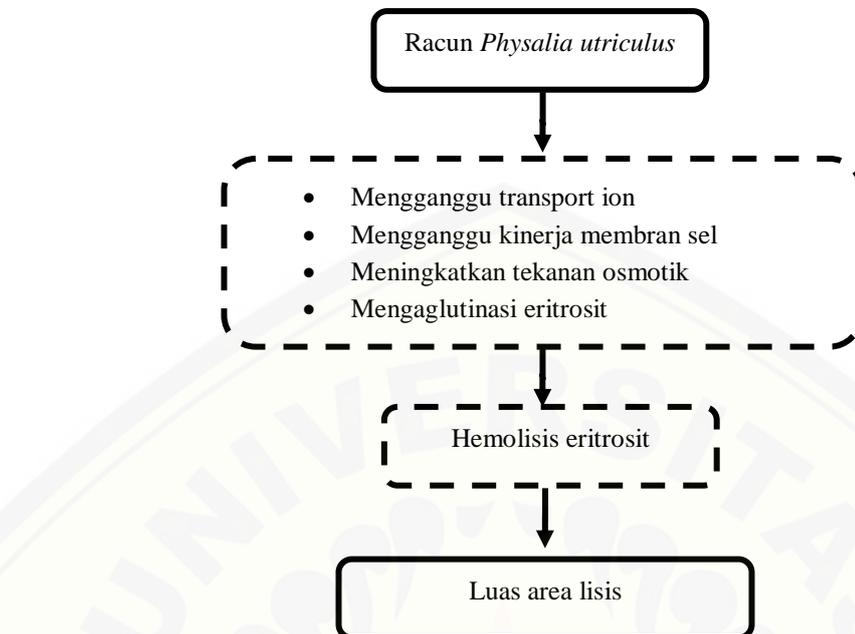
2.3.2 Hemolisis Eritrosit

Hemolisis merupakan destruksi atau penghancuran patologik yang terjadi pada sel darah merah atau eritrosit. Hal ini terjadi karena adanya gangguan pada sel darah merah itu sendiri, maupun karena perubahan lingkungan yang mengakibatkan dari destruksi sel darah merah. Selain itu, hemolisis juga dapat disebabkan oleh racun bakteri, bisa ular parasit pada darah, ataupun larutan hipotonik (Price dan Wilson, 2005). Hemolisis dapat terjadi intravaskuler, dapat juga ekstrasvaskuler, terutama pada system RES yaitu pada lien dan hati. Hemolisis yang terjadi pada eritrosit akan mengakibatkan terurainya komponen-komponen hemoglobin menjadi komponen protein yaitu goblin yang akan dikembalikan ke *pool* protein dan dapat dipakai kembali dan komponen heme akan pecah menjadi dua, yaitu besi dan bilirubin. Besi nantinya akan dikembalikan ke *pool* besi dan dipakai ulang, sedangkan bilirubin akan dieksresikan melalui hati dan empedu (Bakta, 2006). Hemolisis eritrosit dapat dilihat pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6 Hemolisis eritrosit pada media *blood agar plate* (Buxton, 2005)

2.4 Kerangka Konseptual Penelitian



Keterangan :

-  : Variabel diteliti
 : Variabel tidak diteliti
 : Memicu
 : Mengandung

Gambar 2.7 Skema kerangka konsep

2.5 Hipotesis Penelitian

Hipotesis pada penelitian ini racun *Physalia utriculus* dari perairan Papuma Jember toksik terhadap eritrosit secara *in vitro*.

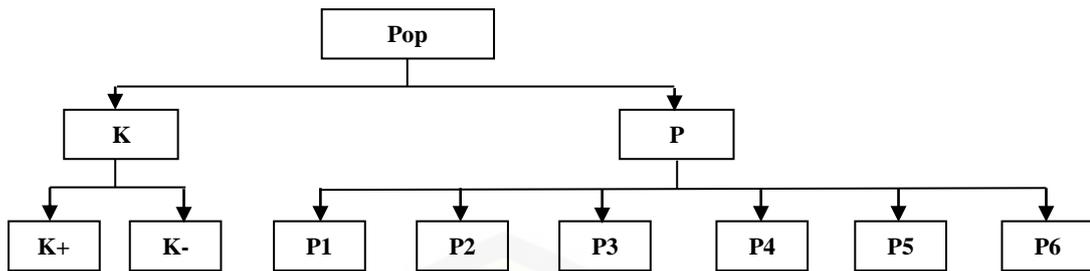
BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian *true experimental* yaitu penelitian dimana peneliti dapat mengontrol semua variabel luar yang mempengaruhi jalannya eksperimen. Ciri utama dari penelitian *true experimental* adalah bahwa sampel yang digunakan untuk eksperimen maupun sebagai kelompok kontrol diambil secara random dari populasi tertentu (Sugiyono, 2011).

3.2 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian *post test only control group design*. Dalam rancangan penelitian ini terdapat dua kelompok yang masing-masing dipilih secara random (R). Kelompok pertama diberi perlakuan (X) dan kelompok lain tidak. Kelompok yang diberi perlakuan disebut kelompok eksperimen dan kelompok yang tidak diberi perlakuan disebut kelompok kontrol (Sugiyono, 2011). Penilaian hanya dilakukan pada *post test* yaitu setelah mendapat perlakuan berupa pemberian toksin. Hasil penelitian dibandingkan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Secara sistematis rancangan penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1



Keterangan:

Pop : Populasi

K : Kelompok kontrol

K+ : Kelompok kontrol positif (100% hemolisis) dengan pemberian Triton X 100 pada venom blood agarose

K- : Kelompok kontrol negatif (tanpa hemolisis) dengan pemberian Ringer Laktat pada venom blood agarose

P : Kelompok perlakuan

P1 : Kelompok perlakuan pertama dengan pemberian 1 mg/ml toksin *Physalia utriculus* pada venom blood agarose.

P2 : Kelompok perlakuan dua dengan pemberian 5 mg/ml toksin *Physalia utriculus* pada venom blood agarose.

P3 : Kelompok perlakuan tiga dengan pemberian 15 mg/ml toksin *Physalia utriculus* pada venom blood agarose.

P4 : Kelompok perlakuan empat dengan pemberian 25 mg/ml toksin *Physalia utriculus* pada venom blood agarose.

P5 : Kelompok perlakuan lima dengan pemberian 50 mg/ml toksin *Physalia utriculus* pada venom blood agarose.

P6 : Kelompok perlakuan enam dengan pemberian 100 mg/ml toksin *Physalia utriculus* pada venom blood agarose.

Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1 Populasi Penelitian

Populasi adalah keseluruhan objek yang menjadi sasaran dari penelitian. Sedangkan sampel adalah sekelompok objek yang diteliti dan dianggap dapat mewakili populasi (Notoatmodjo, 2012). Populasi dalam penelitian ini ialah media *venom blood agarose*. Darah yang digunakan dalam pembuatan media *venom blood agarose* diambil dari manusia dengan golongan darah O, berusia 21 tahun, tampak sehat dengan *vital sign* stabil.

3.3.2 Sampel Penelitian

Sampel adalah sebagian dari jumlah dan karakteristik yang dimiliki oleh populasi, namun meskipun sampel hanya merupakan bagian dari populasi, kenyataan-kenyataan yang diperoleh dari sampel tersebut harus dapat menggambarkan dalam populasi (Sugiyono, 2011). Sampel yang diambil pada penelitian kali ini sesuai dengan rumus Federer sebagai berikut:

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

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

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

$$(r-1) \geq 15/7$$

$$(r-1) \geq 2,1$$

$$r \geq 3,1$$

Keterangan:

t : Jumlah pengelompokan

r : Jumlah pengulangan

Jumlah sampel minimal yang diperlukan pada penelitian ini dibulatkan menjadi 4 pengulangan sampel pada setiap kelompok. Total jumlah kelompok yang ada berjumlah 8 yang terbagi atas 1 kelompok positif, 1 kelompok negatif, dan 6 kelompok perlakuan, dengan jumlah keseluruhan sampel pada penelitian ini adalah 32 sampel.

3.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Waktu pelaksanaan adalah bulan Maret-April 2018.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi toksin *Physalia utriculus* yang dibagi menjadi 6 konsentrasi yang berbeda, yaitu 1 mg/ml, 5 mg/ml, 15 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, dan 100 mg/ml.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini yaitu luas area lisis yang berada pada *venom blood agarose*.

3.5.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini yaitu jenis toksin *Physalia utriculus*, suhu, waktu inkubasi, *venom blood agarose*, ringer laktat, dan Triton X-100.

3.6 Definisi Operasional

3.6.1 Konsentrasi Racun ubur-ubur

Konsentrasi racun ubur-ubur adalah konsentrasi dari racun yang telah diisolasi dari *nematocyst* yang berada di tentakel ubur-ubur melalui metode autolisis. Racun tersebut selanjutnya melalui proses sentrifugasi dan dilakukan pengujian mikroskopis untuk menilai pengeluaran racun dari dalam *nematocyst*. Kemudian racun disaring dan dilipolizer menggunakan *dry freeze vacuum* untuk membentuk kristal racun. Kemudian racun dibuat sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan dengan melarutkan kristal racun dalam aquabides. Skala pengukuran variabel yang digunakan adalah rasio.

Racun kemudian diambil dengan mikro pipet sebanyak 15 μ l. Racun tersebut ditetaskan ditengah media agar. Area lisis diamati setelah 20 jam perlakuan.

3.6.2 Luas Area Hemolisis

Luas area hemolisis adalah luas area yang ada pada *venom blood agarose* yang mengalami hemolisis. Luas area hemolisis diukur dengan cara mengukur luas area yang lisis keseluruhan pada *venom blood agarose* dengan menggunakan aplikasi *Image J*. Luas area hemolisis nantinya dengan satuan mm^2 . Skala pengukuran variabel yang digunakan adalah rasio.

3.6.3 Aplikasi *Image J*

Image J adalah software gratis untuk analisis gambar yang dapat digunakan untuk mengukur panjang, lebar, dan luas dari suatu objek pada gambar digital. Pengukuran akan dilakukan otomatis oleh aplikasi yang sebelumnya dilakukan beberapa pengaturan terdahulu dengan memasukkan indeks jarak nyata pada gambar tersebut. Sehingga aplikasi akan mendapatkan perbandingan antara Panjang dalam gambar dengan panjang objek asli. Satuan dalam aplikasi *Image J* dapat disesuaikan.

3.7 Alat dan Bahan Penelitian

3.7.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat bedah, *micropipet*, *eppendorf micropipet tube*, *microsentrifuge tube*, *olympus interverted microscope*, *waterbath*, *blood collect ACD tube*, gelas kimia, tabung reaksi, aluminium foil, vortex, jarum suntik, kapas, *handscoone*, *torniquet*, lemari pendingin, *sentrifuge*, neraca analitik, mortar, kamera *handphone*, laptop, dan inkubator.

3.7.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah racun *Physalia utriculus*, *whole blood*, aquabides, ringer laktat, Triton X-100, bubuk agar, dan RPMI.

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Uji Kelayakan Etik

Subjek yang digunakan dalam penelitian ini adalah darah manusia dan ubur-ubur *Physalia utriculus* sehingga dalam pelaksanaannya memerlukan uji kelayakan dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

3.8.2 Persiapan Ubur-ubur (*Physalia utriculus*)

Ubur-ubur dibawa ke Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Jember untuk dilakukan identifikasi spesies. Identifikasi

spesies berdasarkan gambaran morfologi. Gambaran morfologi tersebut meliputi gambaran makroskopis (bentuk, panjang dan lebar tubuh, panjang dan jumlah tentakel) dan mikroskopis (struktur *nematocyst* di medusa dan tentakel, serta struktur didalam *nematocyst* dan ukurannya) yang sesuai dengan kriteria.

3.8.3 Proses Isolasi Racun *Physalia utriculus*

Tahap pertama dilakukan pemisahan tentakel dan medusa dari *Physalia utriculus* dengan menggunakan alat bedah. Kemudian tentakel dilarutkan dalam air laut dengan perbandingan 1:5. Kemudian disimpan dalam suhu 4°C selama 24 jam agar terjadi autolisis. Setelah 24 jam, kemudian disentrifugasi selama 30 menit dalam suhu 4°C untuk memudahkan racun dalam nematokista keluar. Setelah itu ambil beberapa tetes dari bagian supernatan untuk dilakukan pengujian mikroskopis untuk menilai keluarnya toksin dari nematokista. Tabung yang berisi tentakel disimpan kembali dalam lemari pendingin pada suhu 4°C selama 24 jam. Kemudian setelah 24 jam, kembali dilakukan sentrifugasi selama 30 menit. Selanjutnya diambil beberapa tetes dari bagian supernatan untuk dilakukan pengujian mikroskopis untuk menilai keluarnya toksin dari nematokista. Prosedur ini dilakukan berulang-ulang hingga hasil dari pemeriksaan mikroskopis menunjukkan sebagian besar dari racun telah keluar dari nematokista. Kemudian ekstrak tentakel yang telah dilarutkan dengan air laut tersebut disaring menggunakan kertas saring sebanyak 4 lapis. Setelah disaring, hasil dari saringan akan di lipolizer untuk memisahkan racun dengan air menggunakan *Dry Freeze Vacum* (Larasati, 2015).

3.8.4 Persiapan Media *Venom Blood Agarose*

Whole blood diambil dari darah manusia sehat dengan golongan darah O berumur 21 tahun. Darah diambil dari pembuluh darah vena mediana cubiti. 3 ml *whole blood* yang diambil disentrifugasi 300 rpm untuk memisahkan antara plasma darah dan sel darah. Plasma yang dihasilkan diambil dengan cara aspirasi dan dibuang. Selanjutnya hanya tersisa RBC saja, dan diukur volumenya. Selanjutnya RBC disuspensikan dengan RPMI untuk membentuk RBC 2% dan

disimpan pada suhu 37°C. Bubuk agar dilarutkan dalam RPMI pada suhu 60°C dengan konsentrasi 3%, kemudian didinginkan sampai suhu 37°C. Volume yang sama dicampurkan (konsentrasi 1:1) dan larutan RBC agarose segera dimasukkan ke dalam *plate* untuk membentuk persegi panjang seragam sesuai keinginan dan ditempatkan pada suhu kamar sampai terbentuk gel. Hasilnya kemudian ditempatkan dalam inkubator kultur jaringan pada suhu 27°C (Yanagihara *et al.*, 2016).

3.8.5 Induksi dan Pengamatan Racun *Physalia utriculus* pada *Venom Blood Agarose*

- a. Pada kelompok kontrol positif (100% hemolisis) dengan pemberian Triton X-100 pada media *venom blood agarose* sebanyak 15 µl.
- b. Pada kelompok kontrol negatif (tanpa hemolisis) dengan pemberian Ringer Laktat pada media *venom blood agarose* sebanyak 15 µl.
- c. Pada perlakuan pertama dengan pemberian 1 mg/ml toksin *Physalia utriculus* pada media *venom blood agarose* sebanyak 15 µl.
- d. Pada perlakuan dua dengan pemberian 5 mg/ml toksin *Physalia utriculus* dengan cara mengencerkan hingga konsentrasi tersebut dan ditambahkan pada media *venom blood agarose* sebanyak 15 µl.
- e. Pada perlakuan tiga dengan pemberian 15 mg/ml toksin *Physalia utriculus* dengan cara mengencerkan hingga konsentrasi tersebut dan ditambahkan pada media *venom blood agarose* sebanyak 15 µl.
- f. Pada perlakuan empat dengan pemberian 25 mg/ml toksin *Physalia utriculus* dengan cara mengencerkan hingga konsentrasi tersebut dan ditambahkan pada media *venom blood agarose* sebanyak 15 µl.
- g. Pada perlakuan lima dengan pemberian 50 mg/ml toksin *Physalia utriculus* dengan cara mengencerkan hingga konsentrasi tersebut dan ditambahkan pada media *venom blood agarose* sebanyak 15 µl.
- h. Pada perlakuan enam dengan pemberian 100 mg/ml toksin *Physalia utriculus* dengan cara mengencerkan hingga konsentrasi tersebut dan ditambahkan pada media *venom blood agarose* sebanyak 15 µl.

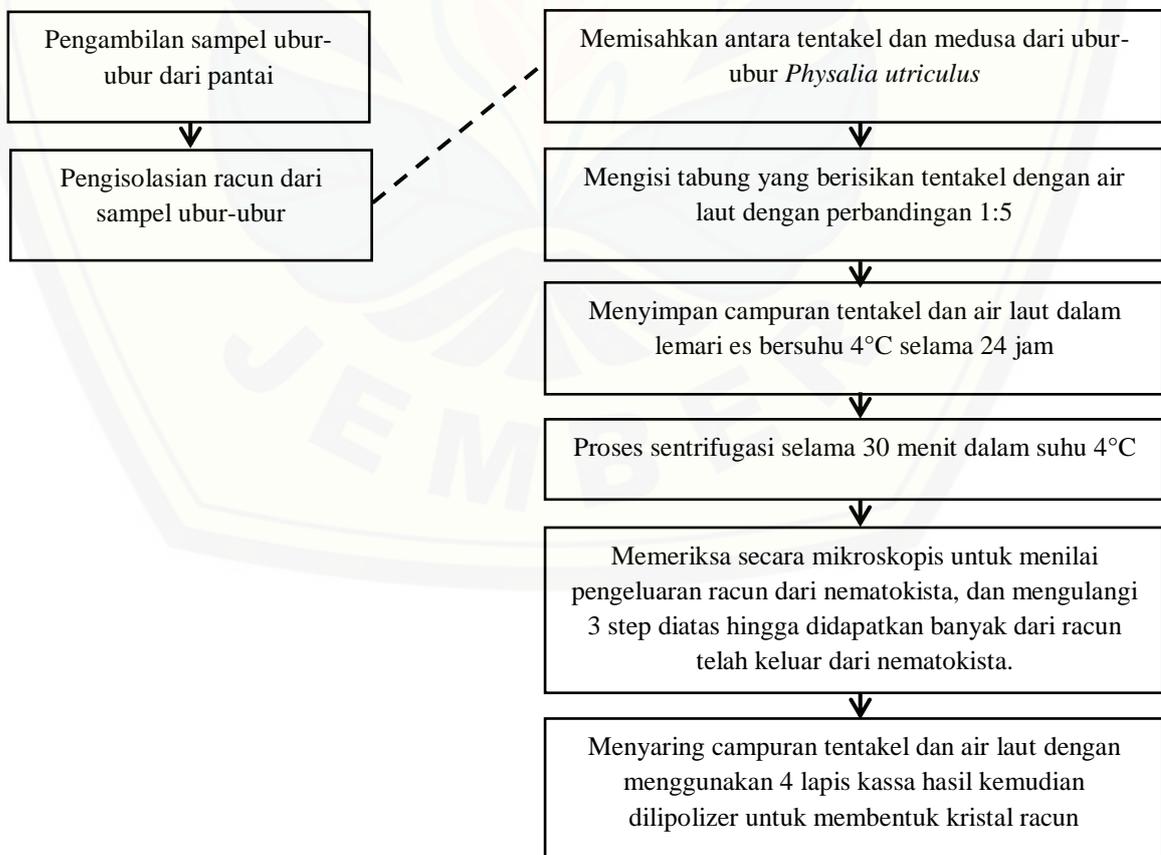
Selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu 27°C dan dilakukan pemotretan pada media *venom blood agarose* pada 20 jam pertama. Luas dari zona yang lisis dihitung dengan memasukkan gambar pada aplikasi *Image J* (Yanagihara *et al.*, 2016).

3.9 Analisis Data

Seluruh data dianalisis dengan uji *Shapiro-Wilk* untuk uji normalitas dan dilakukan uji homogenitas. Jika hasil dari uji normalitas berupa data normal maka dapat dilakukan analisis dengan uji *One Way Anova*. Jika hasil uji homogenitas berupa data yang homogen maka dapat dilanjutkan dengan uji *post hoc Bonferroni* dan *Tukey*, sedangkan jika hasilnya tidak homogen maka dapat dilanjutkan dengan uji *post hoc Tamhane's*.

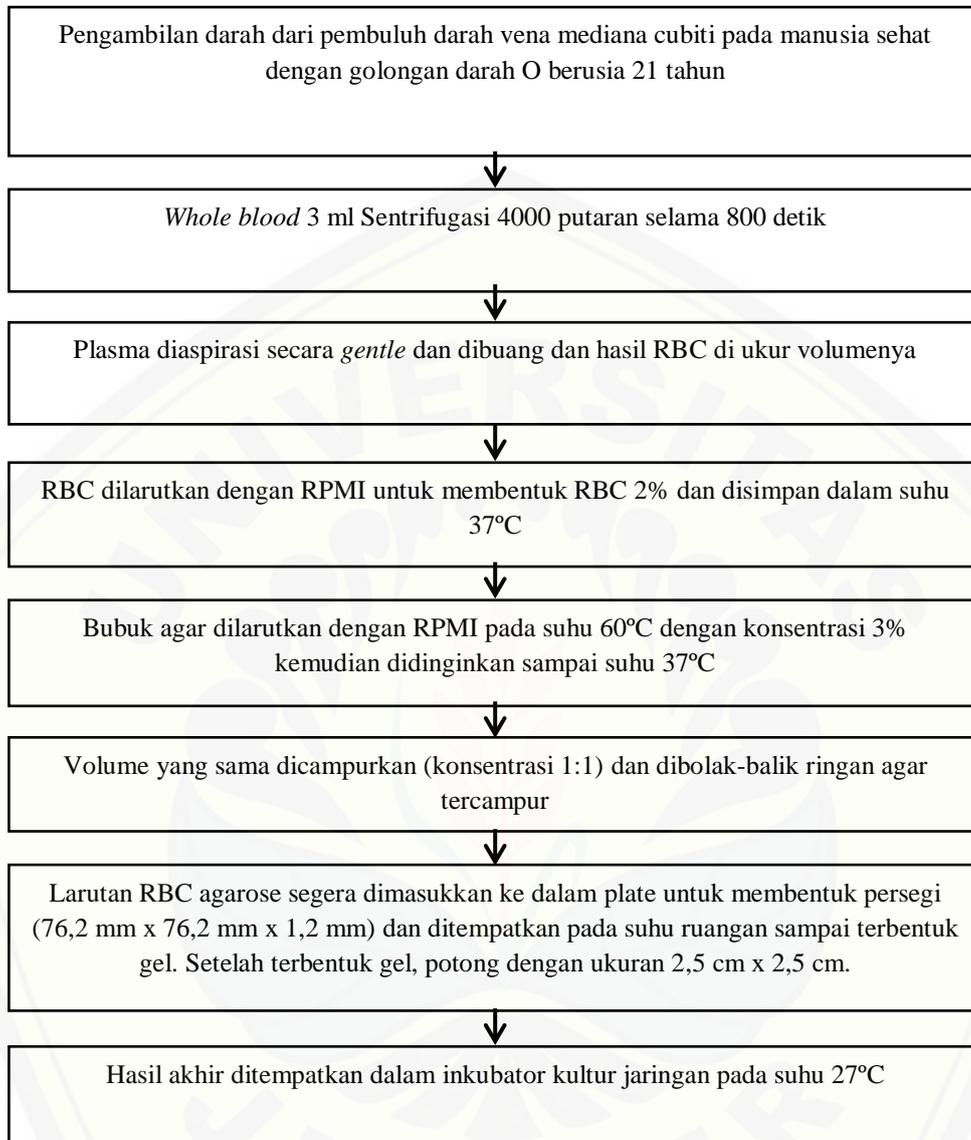
3.10 Alur Penelitian

3.10.1 Pengisolasian Racun Ubur-ubur *Physalia utriculus*



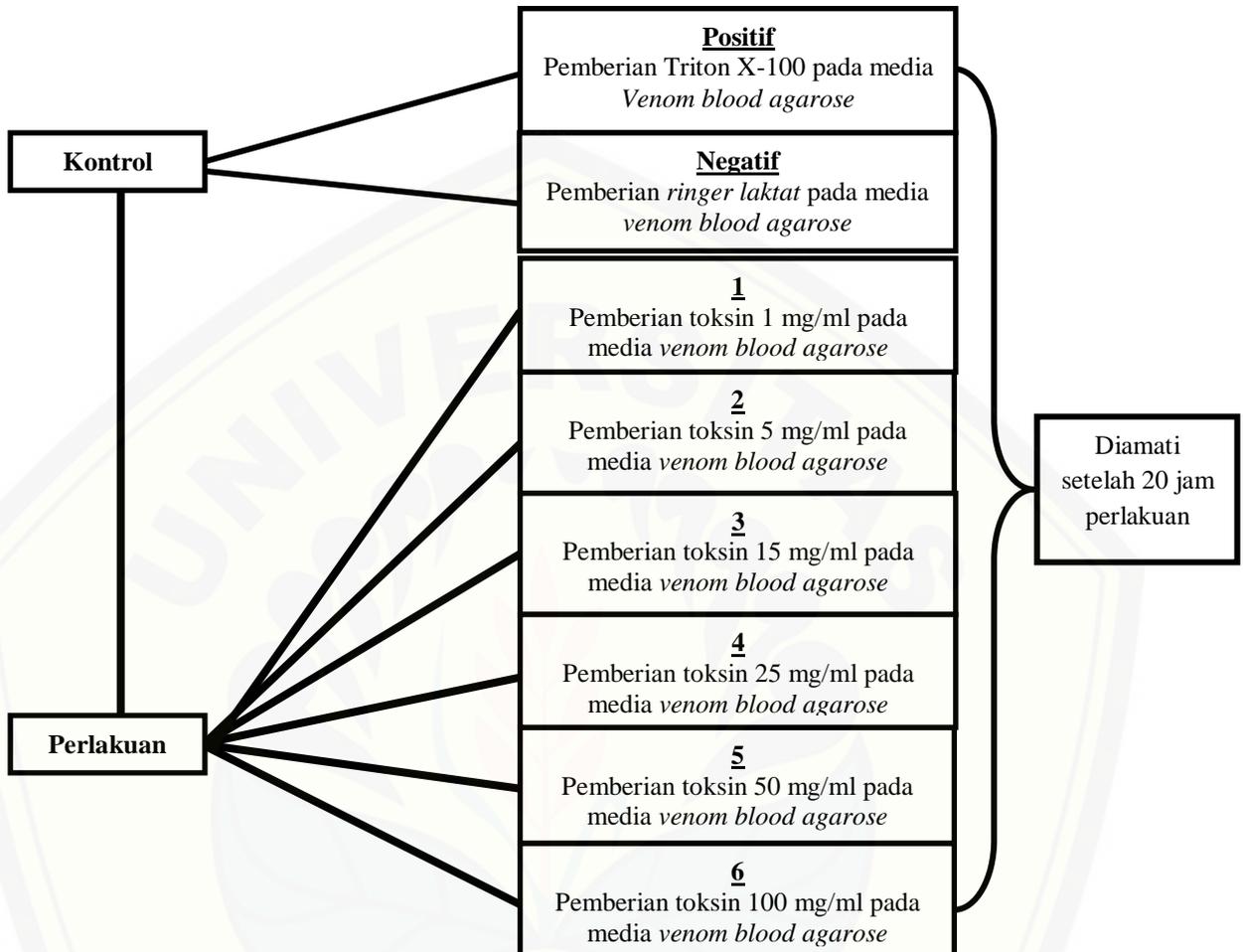
Gambar 3.2 Skema Pengisolasian Racun *Physalia utriculus*

3.10.2 Persiapan Media *Venom Blood Agarose*



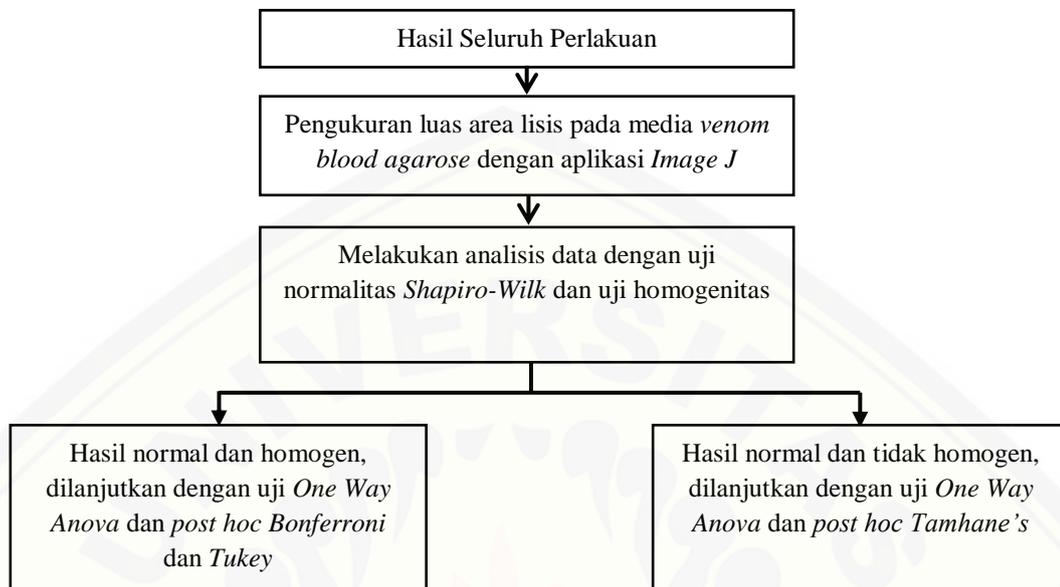
Gambar 3. 3 Skema Persiapan Media *Venom Blood Agarose*

3.10.3 Perlakuan pada Tiap Kelompok



Gambar 3.4 Skema Perlakuan

3.10.4 Penilaian Toksisitas Racun *Physalia utriculus* Pada *Venom blood agarose*



Gambar 3.5 Skema Penilaian Toksisitas Racun *Physalia utriculus* Pada *Venom Blood Agarose*

DAFTAR PUSTAKA

- Alam, J. M., dan R. Qasim. 1991. Toxicology of *Physalia's* (Portugese man-o-war) venom. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol. 4 (2): 68-159
- Alam, J. M., I. Sultana, S. R. Mahmood, dan S. M. Alam. 2006. Pneumotoxic Activity Of Crude Venom and A Cytolytic Protein, PuTx-IVC, From A Coelenterate *Phyalia utriculus* (Blue Bottle). *Pakistan J. Zool*. Vol. 38 (2): 159-165.
- Bais, D. S., W. Che, G. Jiang, Z. Xu, L. Xiao. 2017. Envenomation with Skin Manifestations and Treatments. *Toxicology Open Access*. Vol. 3 (3): 1-10.
- Bakta, I. M. 2006. Hematologi Klinik Ringkas. Jakarta: EGC.
- Bateman, N., R. Jefferson, S. Thomas, J. Thompson, A. Vale. 2014. *Oxford Desk Reference Toxicology*. Inggris: Oxford University Press.
- Bernardo, R. 2004. Box jellyfish sting more than 300. Honolulu Star Bulletin. <http://archives.starbulletin.com/2004/07/12/news/story5.html> [Diakses pada 26 Oktober 2017].
- Blaise, C. dan J. F. Ferard. 2005. Small-scale Freshwater Toxicity Investigations: Hazard Assessment Schemes. Netherlands: Springer. Vol. 2: 1-68.
- Buxton, R. 2005. *Blood Agar Plates and Hemolysis Protocols*. American Society for Microbiology. <https://www.asm.org/index.php/ml-2885> [Diakses pada 3 Januari 2018].
- Cegolon, L., W. C. Heymann, J. H. Lange, G. Mastrangelo. 2013. *Jellyfish Stings and Their Management: A Review*. *Marine Drugs*. Vol. 11: 523-550.
- Chung, J. J., L. A. Ratnapala, I. M. Cooke, dan A. A. Yanagihara. 2001. Partial and Characterization Of A Hemolysin (CAH) From Hawaiian Box Jellyfish (*Carubdea alata*). *Venom Toxicon*, 39: 981-990.
- Dahlan, M. S. 2008. Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan. Jakarta: Salemba Medika Jakarta.
- Edwards, L., dan D. A. Hessinger. 2000. *Portuguese Man-of-war (Physalia physalis)* Venom Induces Calcium Influx Into Cells by Permeabilizing Plasma Membranes. *Toxicon*. Vol. 38 (8): 1015-1028.

- Enhealth. 2012. The Role Of Toxicity Testing In Identifying Toxic Substance In Water. Australia: Australian Health Protection Principal Committee.
- Global Biodiversity Information Facility. 2017. *Physalia utriculus* (Gmelin, 1788). GBIF Backbone Taxonomy. <https://www.gbif.org/species/4339840> [Diakses pada 3 Desember 2018].
- Guyton, Arthur C. 2014. Buku Ajar Fisiologi Kedokteran Edisi 12. Jakarta: EGC.
- Hoover, M. 2004. Marine Invertebrate of Bermuda, *Portuguese Man-of-War (Physalia physalis)*. *Hawaii Med. J.* Vol. 41: 193-194.
- Hornbeak, K. B. dan Auerbach, P. S. 2017. Marine Envenomations. *Emergency Medicine Clinics of North America*. Vol. 35 (2): 321-337.
- Iskandar, D. T. & W. R. Erdelen. 2006. *Conservation of Amphibians and Reptiles Indonesia: Issues and Problems*. *Amphib. Reptil Conserv.* Vol. 4 (1): 60-87.
- Junior, V. H., R. Virga, A. Bechara, L. F. D. Silveira, A. C. Morandini. 2013. *An Outbreak of Portuguese Man-of-war (Physalia physalis – Linnaeus, 1758) Envenoming in Southeastern Brazil*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. Vol. 46 (5): 641-644.
- King, R. 2003. *The Portuguese man-of-War (Physalia physalis)*. South Carolina Departement of Natural Resources. www.dnr.sc.gov/marine/.../The%20Portuguese%20man.pdf [Diakses pada 3 Januari 2018].
- Kurlansky, M. 2002. *Physalia physalis*. Animal Diversity Web. http://animaldiversity.org/accounts/Physalia_physalis [Diakses pada 20 Desember 2017].
- Larasati, D. M. 2015. Pengaruh Induksi Racun Ubur-ubur (*Physalia utriculus*) Terhadap Perubahan Gambar Morfologi Eritrosit Tikus Wistar (*in vivo*) dan Eritrosit Manusia (*in vitro*). *Skripsi*. Jember: Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
- Lane, C. E., dan E. Dodge. 1960. The Toxicity of *Physalia Nematocyst*. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*. Vol. 90 (3): 742-750.
- Lorenza, D. 2016. Pemeriksaan Hitung Jumlah Eritrosit. <http://dindalorenza17.blogspot.com/2016/06/pemeriksaan-hitung-jumlah-eritrosit.html> [Diakses pada 6 Januari 2018].
- Mujiono, N. 2010. *Jellyfish Sting: An Indonesian Case Report*. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan. LIPI*. Vol. 2 (1): 1-8.

- Nontji, Anugerah. 2008. Plankton Laut. Jakarta: LIPI Press.
- Notoatmodjo, S. 2012. Metodologi Penelitian Kedokteran. Jakarta: Rineka Cipta.
- Oppegard, S. C., P. A. Anderson, D. T. Eddington. 2009. Puncture Mechanics of Cnidarian Cnidocysts: A Natural Actuator. *Journal of Biological Engineering*. Vol 3 (17): 1-11.
- Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor 7 Tahun 2014. *Pedoman Uji Toksisitas Nonklinik Secara In Vivo*. 25 Juni 2014. Berita Negara Republik Indonesia Tahun 2014 Nomor 875. Jakarta
- Price, S. A., dan L. M. Wilson. 2005. Patofisiologi Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit. Jakarta: EGC.
- Priyanto. 2009. Toksikologi: Mekanisme, Terapi Antidotum dan Penilaian Resiko. Depok: Lembaga Studi dan Konsultasi Farmakologi.
- Riswanto. 2013. Pemeriksaan Lab Hematologi. Yogyakarta: Alfabeta dan Kanal Medika.
- Sherwood, L. 2012. Fisiologi Manusia Dari Sel Ke Sistem. Jakarta: EGC.
- Suardana, I. W., I. H. Utama, M. H. Wibowo. 2014. Identifikasi *Escherichia coli* O157:H7 dari Feses Ayam dan Uji Profil Hemolisisnya Pada Media Agar Darah. *Jurnal Kedokteran Hewan*. Vol. 8 (1): 1-5
- Schuchert, P. (2018). *Physalia utriculus* (Gmelin, 1788). World Register of Marine Species. <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=387269> [Diakses pada 3 Desember 2017].
- Sugiyono. 2011. Metode Penelitian Kuantitatif, Kualitatif, dan R&D. Bandung: Alfabeta.
- Summer Conference of KSAAE. 2008. Alternatives for Carcinogenity Test and 3R Practice on Animal Care & Use. Korea: Korean Testing & Research Institute.
- Thomas, C. S., S. A. Scott, D. J. Galanis, R. S. Goto. 2001. *Box Jellyfish (Carybdea alata)* in Waikiki: Their Influx Cycle Plus The Analgesic Effect Of Hot And Cold Packs On Their Stings To Swimmers At The Beach: A Randomized, Placebo-controlled, Clinical Trial. *Hawaii Med. J.* Vol. 60 (4): 100-107.

- Tibballs, J., A. A. Yanagihara, H. C. Turner, K. Winkel. 2011. Immunological and Toxinological Responses to Jellyfish Stings. *Inflammation & Allergy – Drug Targets*. Bentham Science Publishers. Vol. 10 (5): 438-446.
- Whitaker, D., R. King, D. Knott. 2014. Jellyfish. Marine Resources Division. www.dnr.sc.gov/marine/pub/seascience/jellyfish.html [Diakses pada 28 Desember 2017]
- Wirasuta, I. M. A. G., dan R. Niruri. 2007. Buku Ajar Toksikologi Umum. Bali: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana.
- Yanagihara, A. A., C. Wilcox, R. King, K. Hurwitz, A. M. Castelfranco. 2016. Experimental Assaysto Assess the Efficacy of Vinegar and Other Topical First-Aid Approaches on Cubozoan (*Alatina alata*) Tentacle Firing and Venom Toxicity. *MDPI. Toxin*. Vol. 8 (19): 1-21.
- Yanagihara, A. A., J. M. Y. Kuroiwa, L. M. Oliver, J. J. Chung, D. D. Kunkel. 2002. Ultrastructure Of A Novel Eurytele Nematocyst Of *Carybdesa alata Reynaud* (Cubozoa, Cnidaria). *Cell Tissue Res*. Vol. 308 (2): 307-318.

LAMPIRAN

Lampiran 1 Persetujuan Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI

UNIVERSITAS JEMBER

KOMISI ETIK PENELITIAN

Jl. Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877 Jember 68121 – Email :
fk_unej@telkom.net

KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK

ETHICAL APPROVA

Nomor : 1.159 /H25.1.11/KE/2018

Komisi Etik, Fakultas Kedokteran Universitas Jember dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul :

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Jember University, With regards of the protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled :

TOKSISITAS RACUN *Physalia utriculus* DARI PERAIRAN PAPUMA JEMBER TERHADAP ERITROSIT SECARA *IN VITRO*

Nama Peneliti Utama : Graita Yuli Ambarwati
Name of the principal investigator

NIM : 142010101054

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Name of institution

Dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.
And approved the above mentioned proposal.

Jember, 12 Maret 2018
Ketua Komisi Etik Penelitian



dr. Rini Riyanti, Sp.PK

Lampiran 2 Informed Consent**PERNYATAAN PERSETUJUAN****(Informed Consent)**

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama :

Alamat :

Usia :

No.HP :

Menyatakan bersedia untuk menjadi subyek penelitian dari:

Nama : Graitia Yuli Ambarwati

Angkatan/NIM : 2014/142010101054

Fakultas : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

dengan judul penelitian “Toksistasitas Racun *Physalia utriculus* dari Perairan Papuma Jember Terhadap Eritrosit Secara *In Vitro*”.

Saya telah diberikan penjelasan mengenai hal tersebut di atas dan saya telah diberikan kesempatan untuk bertanya mengenai hal-hal yang belum dimengerti dan telah mendapatkan jawaban yang jelas dan benar.

Dengan ini saya menyatakan secara sukarela untuk ikut sebagai subyek dalam penelitian ini.

Jember, 2018

Saksi

Subyek Penelitian
(Sukarelawan)

(.....)

(.....)

Lampiran 3 Lembar Penjelasan Untuk Subjek Penelitian

PENJELASAN MENGENAI PENELITIAN TOKSISITAS RACUN *Physalia utriculus* DARI PERAIRAN PAPUMA JEMBER TERHADAP ERITROSIT SECARA *IN VITRO*

Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Jember (Graita Yuli Ambarwati: 142010101054) sedang melakukan penelitian untuk mengetahui apakah terdapat hubungan antara konsentrasi toksin *Physalia utriculus* dari Perairan Papuma Jember dengan luas area hemolisis pada media *venom blood agarose*. Penelitian ini melibatkan seorang subjek penelitian untuk diambil darah venanya. Subjek penelitian tersebut harus memenuhi beberapa kriteria yaitu usia 21 tahun, golongan darah O, dan tidak memiliki riwayat penyakit malaria, anemia, polisitemia vera, leukimia, hemofilia, sepsis, penyakit hiperkoagulan, *Idiopathic Thrombocytopenic Purpura*, trombositopenia.

Saudara memenuhi kriteria yang telah ditetapkan oleh peneliti. Sehingga peneliti meminta Saudara untuk menjadi sukarelawan dalam penelitian ini. Saudara akan diminta untuk mengisi *informed consent* dan menjawab beberapa pertanyaan penelitian tentang identitas dan riwayat kesehatan Saudara, kemudian mengikuti prosedur penelitian ini.

Perlakuan yang akan Saudara terima dimulai dari wawancara karakteristik berupa nama, usia, serta riwayat penyakit Saudara. Selanjutnya Saudara akan diambil darah venanya menggunakan jarum dan tabung vacutainer. Pengambilan darah hanya dilakukan satu kali pengambilan.

Saudara bebas menolak untuk ikut dalam penelitian ini. Apabila Saudara telah memutuskan untuk ikut, Saudara juga bebas untuk mengundurkan diri setiap saat. Semua data penelitian ini akan diperlakukan secara rahasia sehingga tidak memungkinkan orang lain mengetahui dan memanfaatkan data tersebut.

Saudara akan diberi kesempatan untuk menanyakan semua hal yang belum jelas sehubungan dengan penelitian ini. Bila sewaktu-waktu Saudara membutuhkan penjelasan, Saudara dapat menghubungi Graita Yuli Ambarwati, mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Jember pada nomor 081333732934.

Lampiran 4 Prosedur Penelitian

I. Persiapan Darah

1. Mengambil 3 ml *whole blood* donor (21 tahun, golongan darah O) dengan ACD tube.
2. Sentrifuge 4000 putaran selama 800 detik.
3. Buang plasma dengan 23G syringe dari ACD tube.
4. Ambil RBC dan campurkan dengan RPMI untuk membentuk RBC 2%.
5. Simpan pada suhu 37°C

II. Media *Venom Blood Agarose*

1. Mendidihkan RPMI sebanyak 10 mL atau hingga suhu 60°C selama 10-15 menit.
2. Memasukkan bubuk agar secara perlahan dalam RPMI yang mendidih sebanyak 0,3gr untuk membentuk larutan 3% agar.
3. Didinginkan hingga suhu 37°C.
4. Mencampurkan RBC 2% dengan larutan agar 2% dengan perbandingan 1:1.
5. Tuangkan kedalam *plate* untuk membentuk media.
6. Inkubasi pada suhu 27°C.

III. Induksi racun *Physalia utriculus*

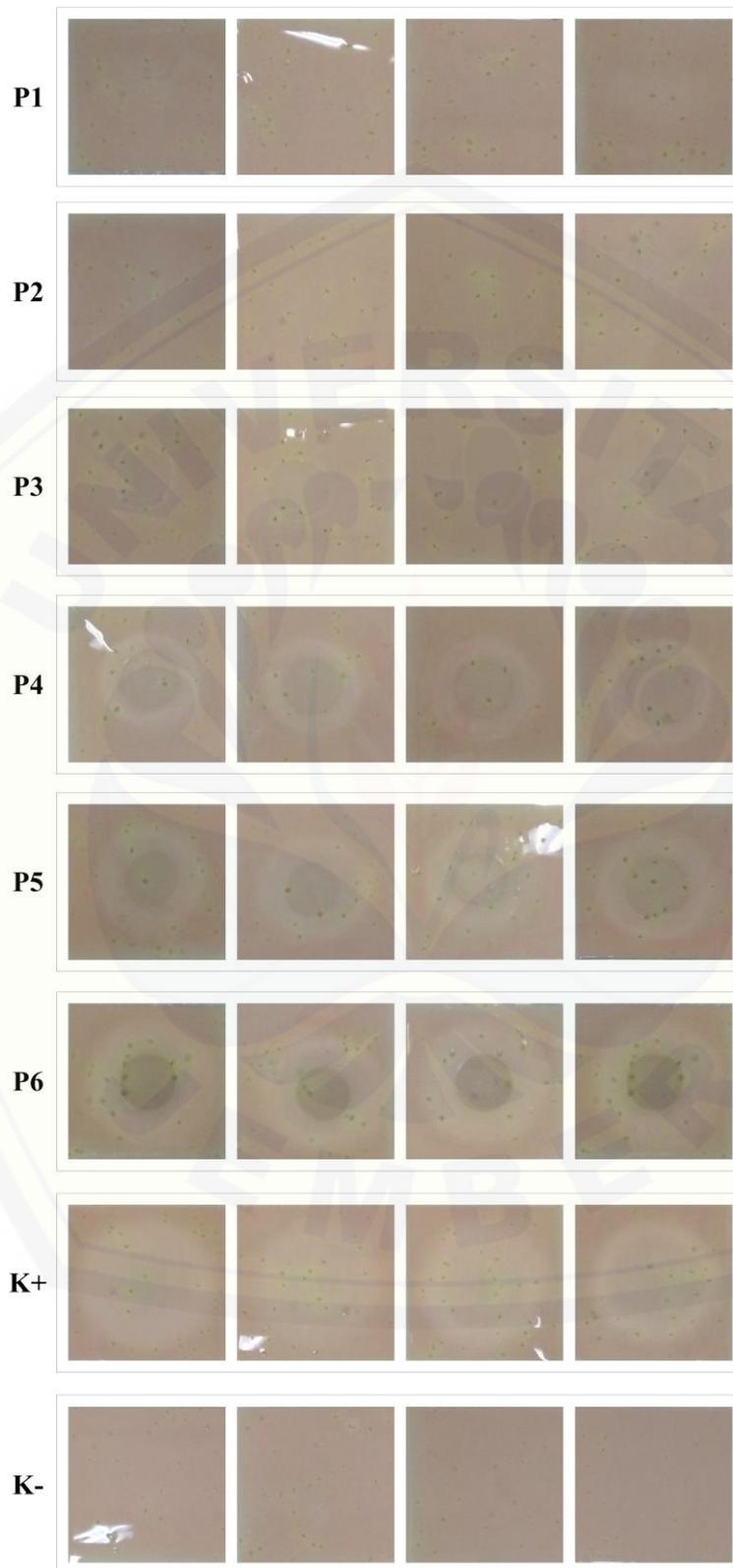
1. Membuat larutan racun dalam *apendolf* dengan kadar 100 mg/ml. Dan diberi label P6.
2. Mengambil 0,5 ml dari P6 untuk diletakkan ke *apendolf* selanjutnya.
3. Tambahkan 0,5 ml NaCl 0,9% kedalam *apendolf* tersebut. Dan diberi label P5 (kadar 50 mg/ml).
4. Mengambil 0,5 ml dari P5 untuk diletakkan ke *apendolf* selanjutnya.
5. Tambahkan 0,5 ml NaCl 0,9% kedalam *apendolf* tersebut. Dan diberi label P4 (kadar 25 mg/ml).
6. Mengambil 0,15 ml dari P6 untuk diletakkan ke *apendolf* selanjutnya.
7. Tambahkan 0,85 ml NaCl 0,9% kedalam *apendolf* tersebut. Dan diberi label P3 (kadar 15 mg/ml).
8. Mengambil 0,3 ml dari P3 untuk diletakkan ke *apendolf* selanjutnya.
9. Tambahkan 0,7 ml NaCl 0,9% kedalam *apendolf* tersebut. Dan diberi label P2 (kadar 5 mg/ml).
10. Mengambil 0,2 ml dari P2 untuk diletakkan ke *apendolf* selanjutnya.
11. Tambahkan 0,8 ml NaCl 0,9% kedalam *apendolf* tersebut. Dan diberi label P1 (kadar 1 mg/ml).
12. Ambil 15 µl dari masing-masing *apendolf* dan letakkan pada media *venom blood agarose* yang telah dibuat.
13. Ambil 15 µl triton X-100 dan letakkan pada media *venom blood agarose* sebagai kontrol positif.
14. Ambil 15 µl NaCl 0,9% dan letakkan pada media *venom blood agarose* sebagai kontrol negatif.
15. Inkubasi pada suhu 27°C.

IV. Pengamatan

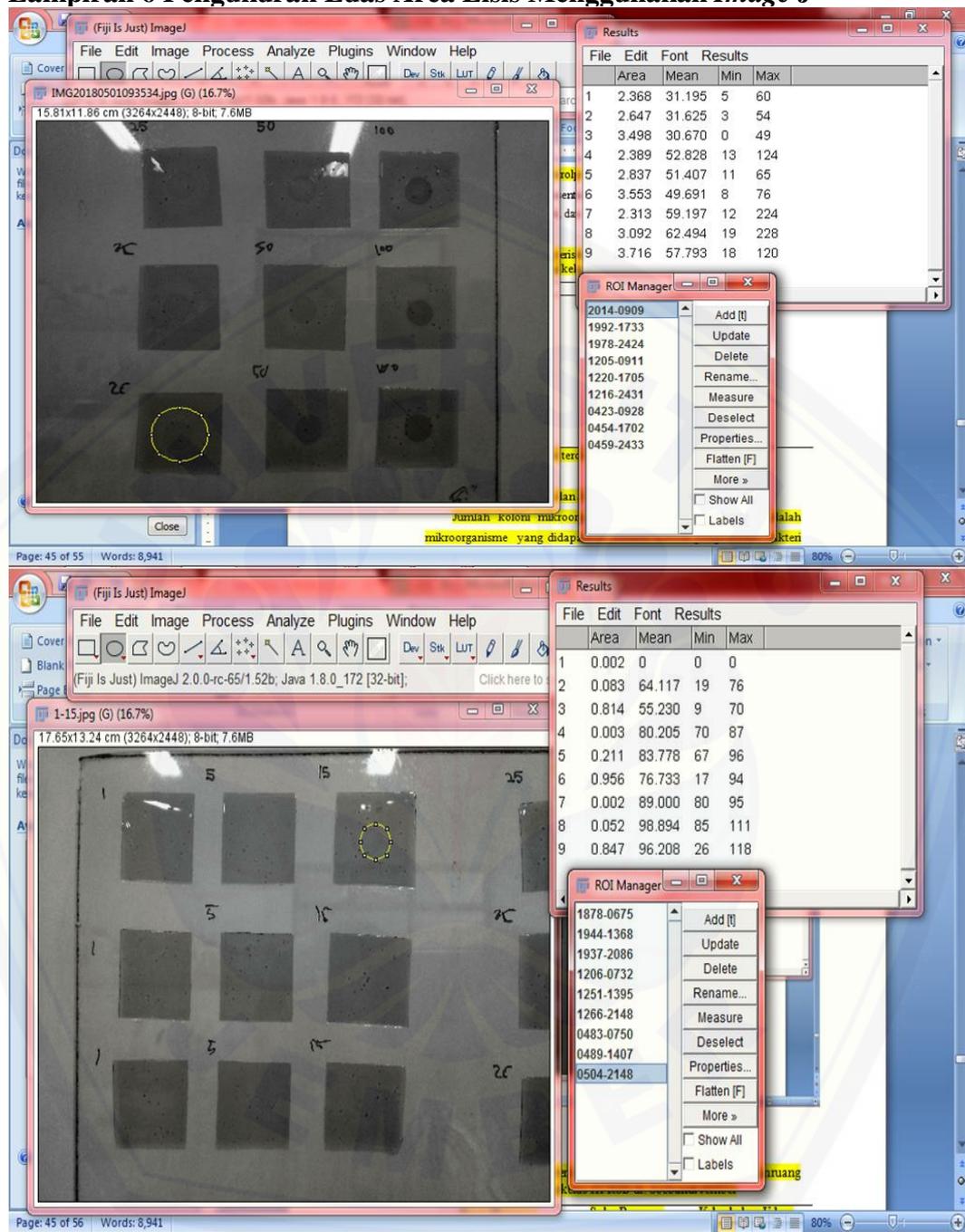
1. Pengambilan gambar dengan kamera handphone dari sudut 90° dengan ketinggian 5 cm setelah 1 jam perlakuan.
2. Mengukur luas area lisis dengan menggunakan aplikasi *Image J*.
3. Analisis data dengan SPSS.



Lampiran 4 Hasil Perlakuan Pada Media *Venom blood agarose*



Lampiran 6 Pengukuran Luas Area Lisis Menggunakan *Image J*



Top Screenshot: T 0,5.jpg (G) (16.7%)

File Edit Image Process Analyze Plugins Window Help

16.55x12.42 cm (3264x2448); 8-bit; 7.6MB

File	Area	Mean	Min	Max
1	3.666	93.863	16	153
2	2.658	90.910	14	118
3	2.383	90.549	13	119
4	3.796	119.514	40	157
5	3.823	120.898	39	185
6	4.758	120.490	18	159
7	4.369	136.874	45	251
8	4.089	143.110	32	248
9	4.761	143.975	27	212

ROI Manager

- 2016-0840
- 1986-1503
- 1980-2163
- 1276-0804
- 1257-1500
- 1236-2133
- 0558-0795
- 0561-1497
- 0534-2154

Bottom Screenshot: T 1 - NaCl.jpg (G) (16.7%)

File Edit Image Process Analyze Plugins Window Help

16.77x12.58 cm (3264x2448); 8-bit; 7.6MB

File	Area	Mean	Min	Max
1	1.071	39.029	7	88
2	0.345	39.580	10	53
3	0.008	37.910	28	44
4	4.836	53.024	7	76
5	4.716	61.979	18	216

ROI Manager

- 2079-0885
- 2082-1659
- 1989-2352
- 1248-0873
- 0531-0882

Page: 45 of 56 Words: 8,941

Page: 46 of 57 Words: 8,941

Tabel 4.2 Karakteristik rawat inapkel...

Lampiran 7 Hasil Pengukuran Luas Area Lisis

Perlakuan	Luas Area Lisis
Kontrol Positif	3.796
Kontrol Positif	3.823
Kontrol Positif	4.369
Kontrol Positif	4.089
Kontrol Negatif	0
Perlakuan 1	0
Perlakuan 2	0
Perlakuan 3	0.814
Perlakuan 3	0.956
Perlakuan 3	1.071
Perlakuan 3	0.847
Perlakuan 4	2.368
Perlakuan 4	2.389
Perlakuan 4	2.383
Perlakuan 4	2.313
Perlakuan 5	2.647
Perlakuan 5	2.837
Perlakuan 5	3.092
Perlakuan 5	2.658
Perlakuan 6	3.498
Perlakuan 6	3.553
Perlakuan 6	3.716
Perlakuan 6	3.666

Lampiran 8 Analisis Menggunakan SPSS

I. Analisis Uji Normalitas

Tests of Normality

	Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Luas Area Lisis	Kontrol Positif	.268	4	.	.890	4	.384
	Perlakuan 3	.240	4	.	.933	4	.613
	Perlakuan 4	.305	4	.	.832	4	.173
	Perlakuan 5	.265	4	.	.867	4	.286
	Perlakuan 6	.218	4	.	.943	4	.672

a. Lilliefors Significance Correction

b. Luas Area Lisis is constant when Perlakuan = Kontrol Negatif. It has been omitted.

c. Luas Area Lisis is constant when Perlakuan = Perlakuan 1. It has been omitted.

d. Luas Area Lisis is constant when Perlakuan = Perlakuan 2. It has been omitted.

II. Analisis Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Luas Area Lisis

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
7.302	7	24	.000

III. Analisis Uji *One Way Anova*

ANOVA

Luas Area Lisis

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	79.850	7	11.407	652.051	.000
Within Groups	.420	24	.017		
Total	80.270	31			

IV. Analisis Uji *Post Hoc Tamhane's*

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Luas Area Lisis

Tamhane

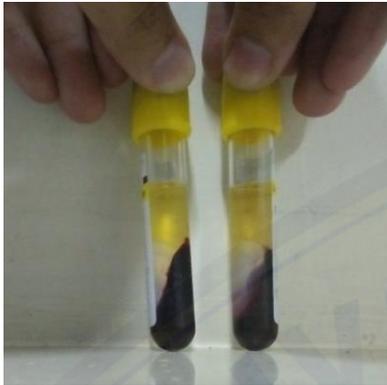
(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol Positif	Kontrol Negatif	4.019250*	.134023	.002	2.60826	5.43024
	Perlakuan 1	4.019250*	.134023	.002	2.60826	5.43024
	Perlakuan 2	4.019250*	.134023	.002	2.60826	5.43024
	Perlakuan 3	3.097250*	.146114	.001	2.04886	4.14564
	Perlakuan 4	1.656000*	.135137	.028	.30027	3.01173
	Perlakuan 5	1.210750*	.169672	.014	.27665	2.14485
	Perlakuan 6	.411000	.143090	.747	-.69164	1.51364

Kontrol Negatif	Kontrol Positif	-4.019250*	.134023	.002	-5.43024	-2.60826
	Perlakuan 1	.000000	.000000	.	.00000	.00000
	Perlakuan 2	.000000	.000000	.	.00000	.00000
	Perlakuan 3	-.922000*	.058199	.015	-1.53472	-.30928
	Perlakuan 4	-2.363250*	.017322	.000	-2.54562	-2.18088
	Perlakuan 5	-2.808500*	.104050	.003	-3.90394	-1.71306
	Perlakuan 6	-3.608250*	.050127	.000	-4.13599	-3.08051
Perlakuan 1	Kontrol Positif	-4.019250*	.134023	.002	-5.43024	-2.60826
	Kontrol Negatif	.000000	.000000	.	.00000	.00000
	Perlakuan 2	.000000	.000000	.	.00000	.00000
	Perlakuan 3	-.922000*	.058199	.015	-1.53472	-.30928
	Perlakuan 4	-2.363250*	.017322	.000	-2.54562	-2.18088
	Perlakuan 5	-2.808500*	.104050	.003	-3.90394	-1.71306
	Perlakuan 6	-3.608250*	.050127	.000	-4.13599	-3.08051
Perlakuan 2	Kontrol Positif	-4.019250*	.134023	.002	-5.43024	-2.60826
	Kontrol Negatif	.000000	.000000	.	.00000	.00000
	Perlakuan 1	.000000	.000000	.	.00000	.00000
	Perlakuan 3	-.922000*	.058199	.015	-1.53472	-.30928
	Perlakuan 4	-2.363250*	.017322	.000	-2.54562	-2.18088
	Perlakuan 5	-2.808500*	.104050	.003	-3.90394	-1.71306
	Perlakuan 6	-3.608250*	.050127	.000	-4.13599	-3.08051
Perlakuan 3	Kontrol Positif	-3.097250*	.146114	.001	-4.14564	-2.04886
	Kontrol Negatif	.922000*	.058199	.015	.30928	1.53472
	Perlakuan 1	.922000*	.058199	.015	.30928	1.53472
	Perlakuan 2	.922000*	.058199	.015	.30928	1.53472
	Perlakuan 4	-1.441250*	.060723	.001	-1.95477	-.92773
	Perlakuan 5	-1.886500*	.119221	.001	-2.63855	-1.13445
	Perlakuan 6	-2.686250*	.076811	.000	-3.09888	-2.27362
Perlakuan 4	Kontrol Positif	-1.656000*	.135137	.028	-3.01173	-.30027
	Kontrol Negatif	2.363250*	.017322	.000	2.18088	2.54562
	Perlakuan 1	2.363250*	.017322	.000	2.18088	2.54562
	Perlakuan 2	2.363250*	.017322	.000	2.18088	2.54562
	Perlakuan 3	1.441250*	.060723	.001	.92773	1.95477
	Perlakuan 5	-.445250	.105482	.461	-1.47235	.58185
	Perlakuan 6	-1.245000*	.053036	.001	-1.66811	-.82189
Perlakuan 5	Kontrol Positif	-1.210750*	.169672	.014	-2.14485	-.27665

	Kontrol Negatif	2.808500*	.104050	.003	1.71306	3.90394
	Perlakuan 1	2.808500*	.104050	.003	1.71306	3.90394
	Perlakuan 2	2.808500*	.104050	.003	1.71306	3.90394
	Perlakuan 3	1.886500*	.119221	.001	1.13445	2.63855
	Perlakuan 4	.445250	.105482	.461	-.58185	1.47235
	Perlakuan 6	-.799750*	.115495	.047	-1.58594	-.01356
Perlakuan 6	Kontrol Positif	-.411000	.143090	.747	-1.51364	.69164
	Kontrol Negatif	3.608250*	.050127	.000	3.08051	4.13599
	Perlakuan 1	3.608250*	.050127	.000	3.08051	4.13599
	Perlakuan 2	3.608250*	.050127	.000	3.08051	4.13599
	Perlakuan 3	2.686250*	.076811	.000	2.27362	3.09888
	Perlakuan 4	1.245000*	.053036	.001	.82189	1.66811
	Perlakuan 5	.799750*	.115495	.047	.01356	1.58594

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran 9 Dokumentasi Penelitian



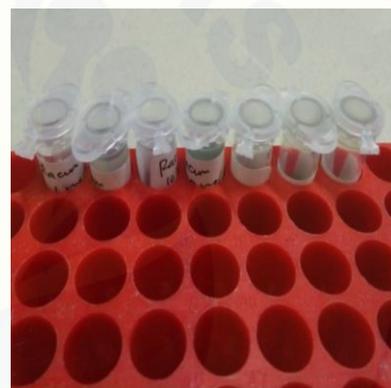
Whole blood setelah di sentrifugasi



Merebus bubuk agar yang dilarutkan dalam RPMI hingga suhu 60°C



Mencampurkan larutan bubuk agar dan RBC 2% (1:1)



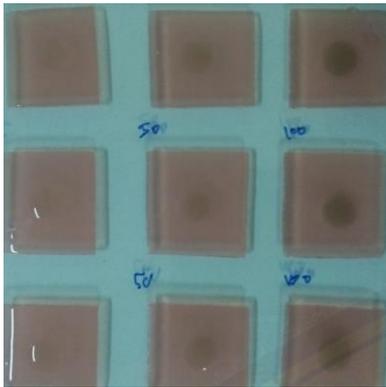
Stok racun *Physalia utriculus*



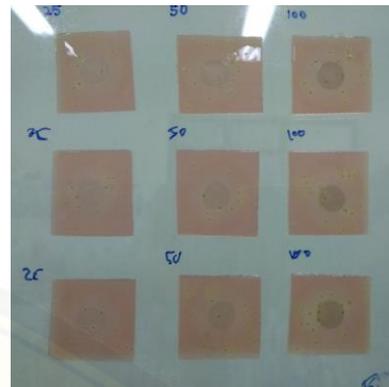
Menuangkan larutan RBC agarose pada plate



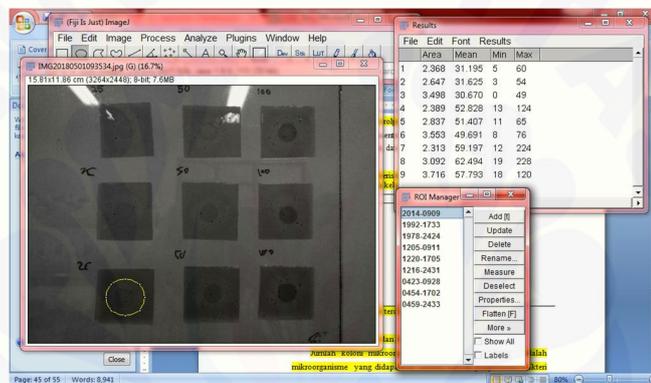
Agar dengan bentuk persegi 2,5 cm x 2,5 cm



Racun *Physalia utriculus* yang di teteskan pada tengah media agarose



Hasil setelah 20 Jam



Pembacaan hasil luas hemolisis dengan aplikasi *Image J*