

DISERTASI

**MEKANISME PENCEGAHAN DISFUNGSI ENDOTEL OLEH KAKAO
(*Theobroma cacao*) MELALUI ANALISIS F2-ISOPROSTAN PLASMA,
EKSPRESI NF κ B, CD-34, DAN Flk-1 PADA TIKUS PUTIH *STRAIN*
Sprague dawley YANG TERPAPAR ASAP ROKOK**



DINA HELIANTI

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

DISERTASI

**MEKANISME PENCEGAHAN DISFUNGSI ENDOTEL OLEH KAKAO
(*Theobroma cacao*) MELALUI ANALISIS F2-ISOPROSTAN PLASMA,
EKSPRESI NF κ B, CD-34, DAN F1 κ -1 PADA TIKUS PUTIH *STRAIN*
Sprague dawley YANG TERPAPAR ASAP ROKOK**

DINA HELIANTI

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

**MEKANISME PENCEGAHAN DISFUNGSI ENDOTEL OLEH KAKAO
(*Theobroma cacao*) MELALUI ANALISIS F2-ISOPROSTAN PLASMA,
EKSPRESI NF κ B, CD-34, DAN Flk-1 PADA TIKUS PUTIH *STRAIN*
Sprague dawley YANG TERPAPAR ASAP ROKOK**

DISERTASI

Untuk memperoleh Gelar Doktor
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor
pada Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
telah dipertahankan di hadapan
Panitia Ujian Doktor Terbuka

Pada hari : Selasa
Tanggal : 20 Januari 2020
Pukul : 10.00-12.00 WIB

Oleh :

**DINA HELIANTI
011317017311**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

LEMBAR PENGESAHAN

**MEKANISME PENCEGAHAN DISFUNGSI ENDOTEL OLEH KAKAO
(*Theobroma cacao*) MELALUI ANALISIS F2-ISOPROSTAN PLASMA,
EKSPRESI NF κ B, CD-34, DAN Flk-1 PADA TIKUS PUTIH *STRAIN*
Sprague dawley YANG TERPAPAR ASAP ROKOK**

TELAH DISETUJUI

PADA TANGGAL 20 JANUARI 2020

Oleh:
Promotor



Prof. Soetjipto, dr., MS., PhD
NIP. 195002171978031002

Kopromotor



Prof. Dr. Widjiati, drh., M.Si
NIP. 1962091519900220001

UCAPAN TERIMA KASIH

Bismillahirrohmaanirrohim.

Alhamdulillah Robbil ‘Alamin. Puji syukur saya panjatkan kehadirat Allah Subhanahu wa Ta’ala atas segala rahmat, nikamt dan karunia-Nya, sehingga saya dapat menyelesaikan dan menyusun naskah disertasi dengan judul “Mekanisme Pencegahan Disfungsi Endotel oleh Kakao (*Theobroma cacao*) Melalui Analisis F2-Isoprostan Plasma, Ekspresi NF κ B, CD-34, dan Flk-1 pada Tikus Putih *Strain Sprague dawley* yang Terpapar Asap Rokok”. Sholawat serta salam saya sampaikan kepada Rasulullah Muhammad Sholallahu ‘alaihi Wa Sallam beserta keluarga dan para sahabat. Semoga kita semua mendapat syafaat beliau.

Disertasi ini dapat saya selesaikan dengan baik berkat arahan, bimbingan, saran dan perbaikan dari banyak pihak. Oleh karena itu dengan segala kerendahan hati perkenankan saya menghaturkan terima kasih yang sebesar-besarnya serta penghargaan yang setinggi-tingginya kepada:

Prof. Soetjipto, dr., MS., PhD selaku Promotor, dengan penuh perhatian dan pengertian, dalam kesibukan yang padat, telah meluangkan waktu untuk senantiasa memberikan arahan, bimbingan, saran dan nasehat sehingga Disertasi ini dapat diselesaikan. Terima kasih yang tak terhingga teriring doa semoga Allah Subhanahu wa Ta’ala memberikan balasan yang lebih baik atas semua semua kebaikannya.

Prof. Ari Gunawan, dr., PhD (alm) selaku Promotor I, dengan penuh perhatian dan pengertian telah meluangkan waktu untuk memberikan arahan, bimbingan dan saran dalam penyusunan usulan disertasi ini. Terima kasih yang tak terhingga teriring doa semoga Allah Subhanahu wa Ta’ala memberikan balasan yang lebih baik atas semua semua kebaikannya.

Prof. Dr. Widjiati, drh. M.Si selaku Ko-Promotor dengan penuh perhatian dan kesabaran, dalam kesibukan yang ada, setiap waktu, telah memberikan arahan, bimbingan, saran, nasehat dan semangat sehingga Disertasi ini dapat diselesaikan. Terima kasih yang tak terhingga teriring doa semoga Allah Subhanahu wa Ta'ala memberikan balasan yang lebih baik atas semua semua kebaikannya.

Prof. Dr. Harjanto JM., dr., AIFM (alm) selaku Ko-Promotor I dengan penuh perhatian dan pengertian, telah meluangkan waktu untuk senantiasa memberikan arahan, bimbingan, saran dan nasehat dalam penyusunan usulan disertasi dan pelaksanaan penelitian disertasi ini. Terima kasih yang tak terhingga teriring doa semoga Allah Subhanahu wa ta'ala memberikan balasan yang lebih baik atas semua semua kebaikannya.

Prof. Dr. I Ketut Suidiana, Drs. M.Si selaku Pembimbing Akademik dan penguji, dengan penuh perhatian dan kesabaran telah meluangkan waktu, untuk berdiskusi, memberikan arahan, bimbingan, saran dan dorongan selama pelaksanaan disertasi sehingga dapat terselesaikan.

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya juga saya haturkan kepada:

Kementrian Riset dan Teknologi Pendidikan Tinggi Republik Indonesia yang telah memberikan kesempatan untuk melanjutkan Pendidikan Pasca Sarjana Jenjang Doktor dan Beasiswa Pendidikan Pascasarjana Dalam Negeri selama saya menempuh pendidikan ini serta Hibah Penelitian Disertasi Doktor.

Prof. Dr. M. Nasih, SE., MT., AK., CMA., selaku Rektor Universitas Airlangga Surabaya, dan Prof. Dr. Fasichul Lisan, Apt., selaku mantan Rektor Universitas Airlangga Surabaya atas kesempatan yang diberikan untuk mengikuti Pendidikan Program Doktor di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.

Prof. Dr. Soetojo, dr., Sp.U(K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas

Airlangga Surabaya dan Prof. Dr. Agung Pranoto, dr., M.Kes., K-EMD, FINASM selaku mantan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya dan seluruh jajaran pimpinan lainnya beserta staf atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya selama menempuh pendidikan ini.

Prof. Dr. H. Joewono Soeroso, dr., M.Sc., SP.PD-KR FINASIM selaku Koordinator Program Studi (KPS) Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya dan Prof. Teddy Ontoseno, dr., Sp.A(K), Sp.JP.AKK selaku mantan KPS yang telah memberikan asuhan akademik selama menempuh pendidikan ini.

Kepada segenap penguji Ujian Pra-kualifikasi, Kualifikasi, Proposal, Kelayakan dan Disertasi tahap I: Prof. Soetjipto, dr., MS., PhD; Prof. Dr. Widjiati, drh., M.Si; Prof. Dr. I Ketut Suidiana, Drs. M.Si; Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh, M.S.; Prof. Dr. Siswandono, Apt., M.S.; Dr. Hari Basuki Notobroto, dr., M.Kes.; Dr. J. Nugroho Eko Putranto, dr., Sp.JP (K), FIHA; Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES yang telah banyak memberikan pemikiran, bimbingan dan saran yang sangat berharga untuk perbaikan naskah disertasi ini menjadi lebih baik. Terima kasih yang tak terhingga teriring doa semoga Allah SWT memberikan balasan yang lebih baik atas semua semua kebaikannya.

Kepada seluruh staf pengajar di Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlaangga Surabaya: Prof. Dr. Suhartono Taat Putra, dr., MS.; Prof. Dr. Harjanto JM., dr. , AIFM (alm); Prof. Dr. I Ketut Suidiana, Drs., M.Si.; Prof. Dr. M. Zainuddin, Apt.; Prof. Dr. Indri Safitri, dr., M.Si.; Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam , drh., MS.; Dr. Widodo JP, dr., MPH.; Dr. Hari Basuki Notobroto, dr., M.Kes.; Dr. Floerentina Sustini, dr., MS.; Dr. Soenaryo, dr., MS.; Dr. Gondo Mastutik, drh., M.Kes dan lainnya yang telah memberikan ilmu pengetahuan dan

pengalaman yang sangat berharga dan memberikan hikmah bagi kehidupan saya. Terima kasih yang tak terhingga teriringi doa semoga Allah Subhanahu wa Ta'ala mencatat kebaikannya sebagai amal jariyah.

Unit Layanan Pengujian (ULP) Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Laboratorium Embriologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Laboratorium Patologi Anatomi, dan Gramik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Terima kasih atas segala bantuan dan kemudahan yang diberikan selama pelaksanaan penelitian.

Seluruh staf di Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor FK Universitas Airlangga Surabaya khususnya mbak Adhdriani, mbak Fitria Isnaini, mbak Mita, mas Ragil dan mas Kiki, terima kasih atas semua bantuan dan layanan administrasi yang diberikan selama saya menempuh pendidikan ini.

Drs. Moh. Hasan, M.Sc., PhD selaku Rektor Universitas Jember dan seluruh jajaran pimpinan lainnya beserta staf atas kesempatan, dukungan dan bantuan yang telah diberikan selama saya menempuh pendidikan ini.

dr. Supangat, M.Kes., PhD., Sp.BA. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember dan dr. Enny Suswati, M. Kes. selaku mantan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember dan seluruh jajaran pimpinan lain beserta staf atas kesempatan dan dukungan yang diberikan selama saya menempuh pendidikan ini.

Kepada kedua orang tua, ayah saya Bpk. Ir. R. Soebroto, M.Sc. (alm), terima kasih yang tak terhingga telah memberi figur dan suri tauladan yang baik semasa hidup beliau dalam bekerja dan menuntut ilmu pada kondisi apapun sehingga saya selalu bangkit dan semangat untuk menyelesaikan pendidikan saya; Ibu saya, Ibu Siti Lestariningsih, SH., terima kasih yang tak terhingga atas pengertian, kesabaran dan kasih sayang tanpa batas kepada saya, senantiasa memberi dukungan, semangat dalam

menyelesaikan pendidikan S3 dan mendoakan keberhasilan pendidikan saya.; serta dr. Soeparimbo Sp.OT. yang senantiasa memberi dukungan dan semangat dalam menyelesaikan pendidikan S3.

Kepada kedua mertua saya Bpk. Soegiarto (alm) dan Ibu Soetimah (alm), terima kasih atas figur dan suri teladan yang baik, membuat saya semangat untuk berjuang dalam menyelesaikan pendidikan S3 ini.

Kepada suami saya Hora Sugiarto, ST yang memberi kesempatan, dukungan, semangat dan kemudahan kepada saya untuk mencapai cita-cita, penuh pengertian dan keikhlasan dalam membimbing dan mengasuh anak-anak selama saya menempuh pendidikan S3 ini. Terima kasih yang tak terhingga semoga kita menjadi keluarga yang sakinah mawaddah wa rohmah.

Kepada anak-anakku tersayang Alifah Khairana, Firman Atha Maulana, Arimbi Hayu Nareswari (walaupun jauh tapi selalu ada di hati), Ahmad Taqiy Zuhron Sugiarto, Alisha Shafa Sugiarto, dan Naila Azka Sugiarto yang selalu menjadi penyemangat untuk menyelesaikan pendidikan ini. Terima kasih yang tak terhingga atas segala pengertian, pengorbanan, semangat dan doanya.

Terima kasih juga saya sampaikan kepada adik-adik saya; Rina Kresnawati, SH, Budi Cahyadi, SP., dr. Miatina Arrisnita Sakti, Sp.THT, Adimas Radix Parikesit, S.Kom, Amorita Parita Sakti, SE dan Aditya Surya Nugraha, S.Sn., kakak ipar saya khususnya Manik Sugiarto SE. dan Nawak Sugiarto, ST. beserta seluruh keluarganya, atas bantuan, semangat, dukungan dan doanya.

Kepada semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu per satu, yang telah membantu saya, baik secara langsung maupun tidak langsung, selama saya menempuh pendidikan ini hingga terselesainya Disertasi ini, terima kasih yang tak terhingga teriringi doa semoga Allah memberi balasan dengan balasan yang jauh lebih baik.

Akhir kata, semoga hasil Disertasi ini dapat memberikan manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan dan berguna bagi masyarakat, khususnya di bidang kesehatan dan memberi manfaat bagi kita semua. Semoga Allah Subhanahu wa Ta'ala senantiasa meridhoinya. Aamiin Yaa Robbal 'Aalamiin.

Surabaya, Maret 2020

Penulis

RINGKASAN

**MEKANISME PENCEGAHAN DISFUNGSI ENDOTEL OLEH KAKAO
(*Theobroma cacao*) MELALUI ANALISIS F2-ISOPROSTAN PLASMA, EKSPRESI
NFκB, CD-34, DAN Flk-1 PADA TIKUS PUTIH STRAIN *Sprague dawley* YANG
TERPAPAR ASAP ROKOK**

Penyakit kardiovaskuler (PKV) merupakan penyebab utama kesakitan dan kematian di dunia. Pada tahun 2008, kematian akibat PKV di dunia mencapai 30% dari total kematian saat itu, dan tahun 2030 diperkirakan meningkat menjadi 37%. Kebiasaan merokok meningkatkan risiko penyakit kardiovaskuler 2-3 kali sedangkan risiko penyakit jantung koroner 2-4 kali. Indonesia merupakan negara ketiga dengan jumlah perokok terbanyak di dunia (27,6%).

Asap rokok mengandung nikotin, CO, tar, serta banyak jenis dan jumlah oksidan yang dapat memicu berbagai efek patologis, khususnya pada endotel. Peningkatan ROS akibat asap rokok menyebabkan peroksidasi lipid pada membran sel endotel dengan produk akhir F2-isoprostan yang dapat dipakai sebagai indikator awal proses aterosclerosis. Asap rokok juga menyebabkan proses inflamasi melalui aktivasi *Nuclear Factor kappa β* (NFκB) yang memicu peningkatan sitokin pro-inflamasi dan selanjutnya menyebabkan endotel teraktivasi yang ditandai dengan peningkatan ekspresi molekul adhesi seperti ICAM-1, dan VCAM-1 sehingga sifat anti-adhesive endotel menurun yang merupakan tanda disfungsi endotel. Selain menyebabkan kerusakan endotel, asap rokok juga mengganggu proses regenerasi dan pemeliharaan endotel. *Endothelial progenitor cells* (EPCs) berperan dalam proses regenerasi endotel, baik melalui sistem parakrin (antara lain *Vascular Endothelial Growth Factor*, *Fibroblast Growth Factor*, IL-6, IL-8, IL-11) atau berdiferensiasi menjadi sel endotel. Penanda EPC yang sering digunakan adalah *Cluster of differentiation 133+* (CD133+), *CD34+* dan *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2+* (VEGFR2+)/*Fetal Liver Kinase-1* (Flk-1).

Data epidemiologi menunjukkan bahwa asupan makanan yang teratur dari tanaman herbal tertentu dapat mengurangi resiko PKV. Kakao (*Theobroma cacao*) atau coklat merupakan bahan makanan yang terbukti bermanfaat bagi kesehatan kardiovaskular. Penelitian Bayard, *et al.*, 2007 pada penduduk Indian Kuna di lepas pantai Panama yang terbiasa mengkonsumsi kakao setiap harinya menunjukkan kematian akibat penyakit kardiovaskuler yang lebih rendah dibandingkan dengan warga negara lain (9.2 ± 3.1 versus 83.4 ± 0.7 kematian disesuaikan usia per 100'000).

Penelitian *in vivo* tentang mekanisme pemberian kakao pada pencegahan disfungsi endotel akibat merokok, dalam hal ini peningkatan ICAM-1 dan VCAM-1 belum banyak dilakukan, sedangkan data penelitian tentang pengaruh kakao pada perokok terhadap kadar EPC dalam sirkulasi darah telah dilaporkan. Penelitian ini ingin mengkaji lebih jauh mekanisme pencegahan disfungsi endotel oleh kakao akibat asap rokok, khususnya hubungan antara jalur stres oksidatif, inflamasi dan aktivasi EPC dengan kebaruan pada peningkatan EPC secara imunohistokimia pada daerah jejas, dalam hal ini *arteria coronaria*. Jalur stres oksidatif menggunakan indikator kadar F2-isoprostan plasma, jalur inflamasi dengan ekspresi NFκB *arteria coronaria* dan jalur aktivasi EPC dengan ekspresi CD34 dan Flk-1 *arteria coronaria*, sedangkan disfungsi endotel menggunakan indikator ICAM-1 dan VCAM-1.

Penelitian ini dilakukan dalam 2 tahap, yaitu tahap 1 untuk menentukan dosis efektif bubuk kakao dalam menurunkan kadar F2-isoprostan plasma; dan tahap 2 untuk menganalisis mekanisme pencegahan disfungsi endotel oleh kakao pada paparan asap

rokok. Pada penelitian tahap 1, digunakan 3 dosis bubuk kakao. Jenis penelitian tahap 1 ini adalah penelitian eksperimental laboratoris dan model rancangannya adalah *posttest- only control group design*. Hewan coba yang digunakan adalah 30 ekor *Rattus norvegicus strain Sprague Dawley*, jantan, umur 3 bulan, berat 280-300 g dikelompokkan secara *random* menjadi 5 kelompok perlakuan, yaitu: kelompok kontrol normal (K0) disonde *aquabidest* 2 ml dan diberi paparan udara sekali sehari; kelompok kontrol paparan asap rokok (K1) disonde *aquabidest* 2 ml dan dipapar asap rokok 1 batang/hari; kelompok kakao 1 diberi kakao dosis 1206 mg/kgBB/hari dan asap rokok 1 batang/hari (P1), kelompok kakao 2 dosis 2411 mg/kgBB/hari dan asap rokok 1 batang/hari (P2), dan kelompok kakao 3 dosis 3616 mg/kgBB/hari dan asap rokok 1 batang/hari (P3). Masing-masing kelompok mendapat perlakuan selama 14 hari. Hari ke-15 hewan coba diterminasi dan dilakukan pemeriksaan F2-isoprostan dengan metode ELISA, selanjutnya dipilih satu dari tiga dosis bubuk kakao yang efektif dalam menurunkan kadar F2-isoprostan plasma.

Hasil penelitian tahap 1 menunjukkan bahwa dosis efektif kakao dalam menurunkan kadar F2-isoprostan plasma adalah 1205 mg/kgBB/hari. Selanjutnya kelompok perlakuan kakao dosis 1205 mg/kgBB/hari pada penelitian tahap 2 disebut kelompok perlakuan (P), bersama dengan kelompok K0 dan K1 dilakukan pemeriksaan NFkB, CD34, Flk-1, VCAM-1 dan ICAM-1. Hasil pemeriksaan penelitian tahap 1 dan 2 menunjukkan bahwa kakao menurunkan ekspresi NFkB, VCAM-1 dan ICAM-1 *arteria coronaria* serta meningkatkan ekspresi CD34 dan Flk-1 *arteria coronaria* pada tikus yang terpapar asap rokok. Hasil uji analisis jalur didapatkan hubungan antara kakao pada kondisi terpapar asap rokok dengan peningkatan CD34 dan penurunan ICAM-1. Selain itu juga terdapat hubungan antara kakao dengan penurunan NFkB dan penurunan VCAM-1.

Temuan baru pada penelitian ini adalah pemberian kakao pada *Rattus norvegicus* yang terpapar asap rokok dapat mencegah disfungsi endotel melalui 2 jalur, yaitu: jalur peningkatan EPC dengan indikator peningkatan CD34 sebagai *marker* EPC dan jalur inflamasi dengan indikator penurunan NFkB sebagai mediator inflamasi. Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai dasar pengetahuan terhadap upaya pencegahan disfungsi endotel akibat asap rokok dengan menggunakan kakao yang dapat diaplikasikan sehari-hari.

SUMMARY

THE PREVENTION MECHANISMS OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION BY CACAO (*Theobroma cacao*) THROUGH ANALYSIS OF PLASMA F2-ISOPROSTAN LEVELS, EXPRESSION OF NF-KB, CD-34, AND FLK-1 ON CIGARETTE SMOKING EXPOSED RAT

Cardiovascular disease (CVD) is the main cause of illness and death in the world. In 2008, deaths due to PKV in the world reached 30% of the total deaths at that time, and by 2030 it is estimated to increase to 37%. Smoking habits increase the risk of cardiovascular disease 2-3 times, while the risk of coronary heart disease 2-4 times. Indonesia is the third country with the highest number of smokers in the world (27.6%).

Cigarette smoke contains nicotine, CO, tar, as well as many types and amounts of oxidants that can help with various pathological effects, especially on the endothelium. The increase in ROS due to cigarette smoke causes lipid peroxidation in the endothelial cell membrane with the final product F2-isoprostane which can be used as an early indicator of the atherogenesis process. Cigarette smoke also causes an inflammatory process through the activation of Nuclear Factor kappa B (NFκB) which triggers an increase in pro-inflammatory cytokines and further causes activated endothelium which affects the expression of adhesion molecules such as ICAM-1, and VCAM-1 so that the anti-adhesive properties of the endothelium decrease which is a sign of endothelial dysfunction. Besides causing endothelial damage, cigarette smoke also interferes with the regeneration and maintenance of endothelium. Endothelial progenitor cells (EPCs) play a role in the process of endothelial regeneration either through the paracrine system (including Vascular Endothelial Growth Factor, Fibroblast Growth Factor, IL-6, IL-8, IL-11) or differentiate into endothelial cells. EPC markers that are often used are Cluster of differentiation 133+ (CD133 +), CD34 + and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2+ (VEGFR2 +)/Fetal Liver Kinase-1 (Flk-1).

Epidemiological data suggest that regular intake of certain herbal plants can reduce the risk of CVD. Cocoa (*Theobroma cacao*) or chocolate is a food ingredient that has been shown to be beneficial for cardiovascular health. A study by Bayard et al., 2007 of residents of Kuna India off the coast of Panama who used to consume cocoa every day showed lower mortality from cardiovascular disease compared to citizens of other countries (9.2 ± 3.1 versus 83.4 ± 0.7 age-adjusted deaths per 100'000).

In vivo studies on the mechanism of cocoa administration on the prevention of endothelial dysfunction due to smoking, in this case, the increase in ICAM-1 and VCAM-1 has not been widely carried out, while research data on the effect of cocoa in smokers on EPC levels in the blood circulation have been reported. This study intends to investigate further the mechanisms for preventing endothelial dysfunction by cocoa due to cigarette smoke, particularly the relationship between oxidative stress, inflammation, and EPC activation with the recency of the immunohistochemical increase in EPC in the injured area, in this case, arteria coronaria. The oxidative stress pathway used an indicator of plasma F2-isoprostane levels, the inflammatory pathway by the expression of the NFκB coronary artery, and the EPC activation pathway by the expression of CD34 and Flk-1 coronary artery, while the endothelial dysfunction used the indicators ICAM-1 and VCAM-1.

This research was conducted in 2 phase. Phase 1 to determine the effective dose of cacao in reducing plasma F2-isoprostane levels; and phase 2 to analyze the mechanisms of preventing endothelial dysfunction by cacao on cigarette smoke exposure. In the first phase

of study, 3 doses of cacao were used. This type of phase 1 is an experimental laboratory with a post-test-only control group design model. The experimental animals used were 30 *rattus norvegicus* strains of Sprague Dawley, males, aged 3 months, weight 200-300 g grouped randomly into 5 treatment groups. The normal control group (K0) received 2 ml of aqua bidest and given air exposure once a day; the cigarette control group (K1) received 2 ml of aqua bidest and given exposure to cigarette smoke once a day. In the treatment group, each group was given exposure to cigarette smoke and given cocoa powder that had been dissolve in aqua bidest. Cacao group 1 was given a dose of 1206 mg/kg BW/day (P1), cacao group 2 was given a dose of 2411 mg/kg BW/day (P2), and cacao group 3 was given a dose of 3616 mg/kg BW/day (P3). Each group was treated for 14 days. On the 15th day, the experimental animals were terminated and F2-isoprostane was examined using the ELISA method, then was selected one of the three doses of cacao was the most effective in reducing plasma F2-isoprostane levels.

The result of phase 1 showed that the effective dose of cacao in reducing plasma F2-isoprostane levels was 1205 mg/kg BW/day. Furthermore, the cacao treatment group with a dose of 1205 mg/kg BW/day in the second phase of the study was called the treatment group (P), together with the K0 and K1 groups, the NFκB, CD34, Flk-1, VCAM-1 and ICAM-1 were examined. The results of examinations in phases 1 and 2 showed that cacao decreased the expression of NFκB, VCAM-1, and ICAM-1 arteria coronaria and increased the expression of CD34 and Flk-1 coronary artery in rats exposed to cigarette smoke. The result of the path analysis test showed that there was a relationship between cacao in the condition of exposure to cigarette smoke with an increase in CD34 and a decrease in ICAM-1. In addition, there is also a relationship between cacao and a decrease in NFκB and a decrease in VCAM-1.

New in this study, presenting cacao to *Rattus norvegicus* exposed to cigarette smoke can prevent endothelial dysfunction in 2 ways: the pathway of increasing EPC and an inflammatory pathway with a decrease in NFκB as an inflammatory mediator. The results of this study can be used as a basis for knowledge of prevention disease due to cigarette smoke by using cacao which can be applied daily.

ABSTRACT**The Prevention Mechanisms of Endothelial Dysfunction by Cacao (Theobroma Cacao) Through Analysis of Plasma F2-Isoprostan Levels, Expression of NF- κ B, CD-34, and Flk-1 on Cigarette Smoking Exposed Rat****Dina Helianti**

Background: Smoking has known as causative factor of cardiovascular disease that was started with endothelial dysfunction. Polyphenols has known significantly prevent endothelial dysfunction. Cacao is a rich source of polyphenols. This study was designed to evaluate the cardioprotective effects of cocoa that mediated through the anti-oxidant effect, and was measured by plasma F2-isoprostane level, anti-inflammatory effect by expression of NF κ B, and Endothelial Progenitor Cell (EPC) activation by expression of CD-34 and Flk-1 in coronary arteries. The condition of endothelial dysfunction was measured by expression of ICAM-1 and VCAM-1 in coronary arteries.

Material and Methods: These research was conducted in 2 phases: the first phase determined the effective dose of cocoa in reducing plasma F2-isoprostane level and the second phase analyzed the preventing mechanism of endothelial dysfunction by cocoa on cigarette smoke exposure. This study using cocoa powder. In the first phase, 3 doses of cocoa were used. This study subjected rats, divided into five groups: the normal control group (2 ml of aquabidest, air exposure); the cigarette control group (2 ml of aquabidest, cigarette smoke); cacao group 1 (1205 mg/kg BW/day, cigarette smoke); cocoa group 2 (2410 mg/kg BW/day, cigarette smoke); cacao group 3 (3615 mg/kg BW/day, cigarette smoke). Each group was treated for 14 days. In the second phase of the study using the optimal dose of cacao, based on the results from the first phase. NF κ B, CD34, Flk-1, VCAM-1 and ICAM-1 were measured by immunohistochemistry.

Results: Cocoa 1205 mg/kg/day significantly decreases plasma F2-isoprostane level, NF κ B, ICAM-1 and VCAM-1 expression of coronary arteries in cigarette smoking exposed rat ($p < 0,05$). There was not a significant increases CD-34 but there was a significant increases in Flk-1 expression ($p < 0,05$).

Conclusions: Cocoa in cigarette smoke-exposed rats can prevent endothelial dysfunction in 2 ways: the pathway of increasing EPC and an inflammatory pathway with a decrease in NF κ B as an inflammatory mediator. The results of this study can be used as a basis for preventing endothelial dysfunction due to cigarette smoke by using cocoa.

Keywords: cigarette smoke exposure, cacao, F2-isoprostane, EPC, endothelial dysfunction

DAFTAR ISI

Sampul Dalam	i
Lembar Awal	ii
Lembar Prasyarat Gelar	iii
Lembar Pengesahan	iv
UCAPAN TERIMA KASIH	v
RINGKASAN	xi
SUMMARY	xiii
ABSTRAK	xv
DAFTAR ISI	xvi
DAFTAR TABEL	xxi
DAFTAR GAMBAR	xxii
DAFTAR LAMPIRAN	xxiv
DAFTAR SINGKATAN	xxv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	7
1.3. Tujuan Penelitian	8
1.3.1 Tujuan umum penelitian	8
1.3.2 Tujuan khusus penelitian	8
1.4. Manfaat Penelitian	9
1.4.1 Manfaat teoritik	9
1.4.2 Manfaat praktis penelitian	9
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	10
2.1. Asap Rokok	10
2.1.1 Sejarah rokok	10
2.1.2 Definisi merokok	10
2.1.3 Jenis rokok	11
2.1.4 Kandungan kimia asap rokok	12
2.1.5 Rokok sebagai sumber radikal bebas dan pemicu inflamasi	14
2.1.6 Rokok dan penyakit kardiovaskular	15

2.2. Radikal Bebas	16
2.3. F2 Isoprostan	18
2.4. Inflamasi	19
2.5. Struktur Umum Pembuluh Arteri	20
2.6. Endotel	22
2.7. Disfungsi Endotel	24
2.8. Patogenesis Aterosklerosis	25
2.9. Kakao (<i>Theobroma cacao</i>)	27
2.9.1 Asal usul tanaman kakao	27
2.9.2 Botani tanaman kakao	28
2.9.3 Senyawa aktif bubuk kakao	30
2.10. <i>Endothelial Progenitor Cell</i>	33
2.10.1 Asal dan Diferensiasi EPC	34
2.10.2 Karakteristik EPC	37
2.10.3 Mobilisasi dan homing EPC	38
2.10.4 Peran EPC dalam regenerasi sel endotel	40
2.10.5 Pengaruh stres oksidatif akibat merokok pada EPC...	41
BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL	43
3.1 Kerangka Konseptual Penelitian	43
3.2 Penjelasan Kerangka Konseptual	44
3.3. Hipotesis Penelitian	45
BAB 4 METODE PENELITIAN	47
4.1 Penelitian Tahap 1	47
4.1.1 Jenis dan Rancangan Penelitian	47
4.1.2 Unit eksperimen, Replikasi, dan Alokasi Random	48
1. Unit Eksperimen	48
2. Replikasi	49
3. Alokasi random	50
4.1.3 Variabel Penelitian	50
4.1.4 Definisi Operasional	51
4.1.5. Alat dan Bahan Penelitian	52
1. Alat penelitian	52
2. Bahan Penelitian	54

3. Unit analisis	55
4.1.6. Lokasi Penelitian	55
4.1.7 Prosedur Penelitian	55
1. Persiapan Penelitian	55
2. Tahap Perlakuan	56
3. Tahap Pengumpulan Data	58
4.1.8 Alur Penelitian	59
4.1.9 Analisis Data	60
4.2 Penelitian Tahap 2.....	60
4.2.1 Rancangan Penelitian.....	60
4.2.2 Unit Eksperimen, Replikasi, dan Alokasi Random	61
4.2.3 Variabel Penelitian.....	62
4.2.4 Definisi Operasional.....	62
4.2.5 Alat dan Bahan Penelitian	64
1. Alat Penelitian.....	64
2. Bahan Penelitian.....	64
3. Unit Analisis.....	65
4.2.6 Lokasi Penelitian.....	65
4.2.7 Prosedur Penelitian.....	65
4.2.8 Alur Penelitian.....	66
4.2.9 Analisis Data	67
BAB 5	68
HASIL PENELITIAN	
5.1 Penelitian Tahap 1	68
5.2 Penelitian Tahap 2	71
5.2.1 Hasil Pemeriksaan Imunohistokimia Ekspresi NFkB <i>Arteria Coronaria</i>	71
5.2.2 Hasil Pemeriksaan Imunohistokimia Ekspresi CD34 <i>Arteria Coronaria</i>	73
5.2.3 Hasil Pemeriksaan Imunohistokimia Ekspresi Flk-1 <i>Arteria Coronaria</i>	76
5.2.4 Hasil Pemeriksaan Imunohistokimia Ekspresi VCAM-1 <i>Arteria Coronaria</i>	78

5.2.5 Hasil Pemeriksaan Imunohistokimia Ekspresi ICAM-1	
<i>Arteria Coronaria</i>	81
5.3 Hasil Analisis Jalur Mekanisme Pencegahan Disfungsi	
Endotel oleh Bubuk Kakao melalui Kadar F2-isoprostan	
Darah dan Ekspresi NfκB, ICAM-1, CD34 dan Flk-1	
<i>Arteria Coronaria</i> pada Tikus Putih yang Terpapar Asap	
Rokok	84
BAB 6 PEMBAHASAN	88
6.1 Penelitian Tahap 1	88
6.1.1 Analisis Penurunan Kadar F2-Isoprostan Plasma oleh	
Kakao	88
6.2 pada <i>Rattus norvegicus</i> yang Terpapar Asap Rokok	92
Penelitian Tahap 2.....	92
6.2.1 Analisis Penurunan Ekspresi NFκB <i>Arteria</i>	
<i>Coronaria</i> oleh Bubuk Kakao pada <i>Rattus norvegicus</i>	
yang Terpapar Asap Rokok	92
6.2.2 Analisis Peningkatan Ekspresi CD34 <i>Arteria</i>	
<i>Coronaria</i> oleh Bubuk Kakao pada Tikus yang Terpapar	
Asap Rokok	95
6.2.3 Analisis Peningkatan Ekspresi Flk-1 <i>Arteri Coronaria</i>	
oleh Bubuk Kakao pada Tikus yang Terpapar Asap	
Rokok	97
6.2.4 Analisis Penurunan Ekspresi VCAM-1 <i>Arteria</i>	
<i>Coronaria</i> oleh Bubuk Kakao pada <i>Rattus norvegicus</i>	
yang Terpapar Asap Rokok	99
6.2.5 Analisis Penurunan Ekspresi ICAM-1 <i>Arteria</i>	
<i>Coronaria</i> oleh Bubuk Kakao pada <i>Rattus norvegicus</i>	
yang Terpapar Asap Rokok	101
63 Mekanisme Pencegahan Disfungsi Endotel oleh Bubuk	
Kakao melalui Analisis F2-isoprostan Plasma dan	
Ekspresi NFκB, CD34 dan Flk-1 <i>Arteria Coronaria</i> pada	
Tikus yang Terpapar Asap Rokok.....	104

64	Temuan Baru	107
6.5	Keterbatasan Penelitian	108
BAB 7	PENUTUP	110
7.1	Kesimpulan	110
7.2	Saran	110
	DAFTAR PUSTAKA	112
	LAMPIRAN	121

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 5.1 Nilai rerata kadar F2-isoprostan plasma	68
Tabel 5.2 Nilai rerata ekspresi NFkB <i>arteria coronaria</i>	71
Tabel 5.3 Nilai rerata ekspresi CD34 <i>arteria coronaria</i>	73
Tabel 5.4 Nilai rerata ekspresi Flk-1 <i>arteria coronaria</i>	76
Tabel 5.5 Nilai rerata ekspresi VCAM-1 <i>arteria coronaria</i>	79
Tabel 5.6 Nilai rerata ekspresi ICAM-1 <i>arteria coronaria</i>	81

DAFTAR GAMBAR

		Halaman
Gambar 2.1	Tanaman kakao/ <i>Theobroma Cacao</i>	28
Gambar 2.2	Struktur polifenol kakao (<i>Theobroma cacao</i>)	31
Gambar 2.3	Jalur dan profil dari ekspresi diferensias EPC manusia yang berasal dari bone marrow	36
Gambar 2.4	Sifat serta penanda antigen permukaan early EPC dan late EPC.....	38
Gambar 2.5	Konsep perbedaan fungsi dari early dan late outgrowth EPC pada homeostasis vaskular dan neovaskularisasi	41
Gambar 2.6	Pada penyakit kardiovaskular dan kondisi dengan resiko stres oksidatif dimana terjadi penurunan jumlah dan fungsi EPC menyebabkan gangguan proses perbaikan vaskular dan neoangiogenesis	42
Gambar 3.1	Kerangka konseptual penelitian	43
Gambar 4.1	Rancangan penelitian tahap 1	48
Gambar 4.2	Alat Paparan Asap Rokok	53
Gambar 4.3	Kerangka operasional tahap 1	59
Gambar 4.4	Rancangan penelitian tahap 1 dan 2	61
Gambar 4.5	Kerangka operasional tahap 1 dan 2	66
Gambar 4.6	Analisis Jalur	67
Gambar 5.1	Nilai rerata kadar F2-isoprostan plasma	69
Gambar 5.2	Nilai rerata ekspresi NFkB <i>arteria coronaria</i>	71
Gambar 5.3	Perbandingan ekspresi CD34 <i>arteria coronaria</i> antar kelompok perlakuan	73
Gambar 5.4	Nilai rerata ekspresi CD34 <i>arteria coronaria</i>	74

Gambar 5.5	Perbandingan ekspresi CD34 <i>arteria coronaria</i> antar kelompok perlakuan	75
Gambar 5.6	Nilai rerata ekspresi Flk-1 <i>arteria coronaria</i>	76
Gambar 5.7	Perbandingan ekspresi Flk-1 <i>arteria coronaria</i> antar kelompok perlakuan.....	78
Gambar 5.8	Nilai rerata ekspresi VCAM-1 <i>arteria coronaria</i>	79
Gambar 5.9	Perbandingan ekspresi VCAM-1 <i>arteria coronaria</i> antar kelompok perlakuan.....	80
Gambar 5.10	Nilai rerata ekspresi ICAM-1 <i>arteria coronaria</i>	81
Gambar 5.11	Perbandingan ekspresi ICAM-1 <i>arteria coronaria</i> antar kelompok perlakuan	83
Gambar 5.12	Hasil analisis jalur mekanisme disfungsi endotel oleh asap rokok melalui analisis F2-isoprostan plasma dan ekspresi NFkB, CD34 dan Flk-1 <i>arteria coronaria Rattus norvegicus</i>	84
Gambar 5.13	Hasil analisis jalur mekanisme pencegahan disfungsi endotel oleh kakao melalui analisis F2-isoprostan plasma dan ekspresi NFkB, CD34 dan Flk-1 <i>arteria coronaria</i> pada <i>Rattus norvegicus</i> yang diberi paparan asap rokok	86
Gambar 6.1	Model jalur mekanisme pencegahan disfungsi endotel oleh kakao	107

DAFTAR LAMPIRAN

		Halaman
Lampiran 1	<i>Ethical clearance</i>	120
Lampiran 2	Laporan hasil uji kadar polifenol bubuk kakao.....	121
Lampiran 3	Tabel volume maksimum larutan sediaan uji untuk hewan	122
Lampiran 4	<i>Table conversion of human doses to animal doses based on BSA</i>	123
Lampiran 5	Hasil analisis statistik	124
Lampiran 6	Hasil analisis jalur	131
Lampiran 7	Artikel jurnal terindeks Scopus	161

DAFTAR SINGKATAN

ATP	Adenosin trifosfat
CAC	<i>Circulating angiogenic cell</i>
CD34	<i>Cluster of differentiation 34</i>
CD133+	<i>Cluster of differentiation 133</i>
ClO ⁻	<i>Ion hypochlorite</i>
CO	Karbon monoksida
CO ₂	Karbon dioksida
EDRF	<i>Endothelial-derived Relaxation Factor</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EPC	<i>Endothelial progenitor cells</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immunoassay</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
Flk-1	<i>Fetal Liver Kinase-1</i>
FMD	<i>Flow-mediated dilation</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
HPLC	<i>Hight performance liquid chromatographi</i>
H ₂ O ₂	<i>Hydrogen peroxide</i>
HSC	<i>Hematopoetic Stem Cell</i>
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cell</i>
IB	<i>Index Brinkman</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecul 1</i>
IFN- γ	<i>Gamma interferon</i>
I κ B	<i>Inhibitor kappa B</i>
IKK	<i>IκB kinase</i>
IL-1 β	<i>Interleukin-1β</i>
IL-6	<i>Interleukin-6</i>
MDA	<i>malondialdehyde</i>
NADPH	Nikotinamida adenine dinukleotida fosfat
NF κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>

NGT	<i>Naso gastric tube</i>
NO	<i>Nitric oxide</i>
• O ₂ ⁻	Anion superoksida
• OH	Radikal hidroksil
• OOH	Radikal peroksil
PAH	<i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbons</i>
Pb	Timbal
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PGI ₂	Prostaglandin prostasiklin
PJK	Penyakit Jantung Koroner
PKV	Penyakit kardiovaskuler
PUFA	<i>Polyunsaturated fatty acids</i>
Riskesdas	Riset Kesehatan Dasar
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SKRT	Suvey kesehatan rumah tangga
SNR	Senyawa nitrogen reaktif
SOD	Superoksida dismutase
TBARS	<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-α</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR2	<i>Vascular endothelial growth factor receptor 2</i>
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion protein 1</i>