

TESIS

**PENGARUH PEMBERIAN DEHYDROEPIANDROSTERONE
(DHEA) TERHADAP AKTIVITAS PEROKSIDASI LIPID DAN
KADAR NITRIT OKSIDA PADA AORTA TIKUS WISTAR JANTAN
YANG TERPAPAR ASAP ROKOK**

*THE EFFECTS OF DEHYDROEPIANDROSTERONE (DHEA) ON
LIPID PEROXIDATION ACTIVITY AND NITRITE OXIDE
CONCENTRATION IN THE AORTA OF MALE WISTAR RATS DUE
TO EXPOSURE OF CIGARATTE SMOKE*

NILA RIDHAYANI



**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2022**

TESIS

**PENGARUH PEMBERIAN DEHYDROEPIANDROSTERONE
(DHEA) TERHADAP AKTIVITAS PEROKSIDASI LIPID DAN
KADAR NITRIT OKSIDA PADA AORTA TIKUS WISTAR JANTAN
YANG TERPAPAR ASAP ROKOK**

*THE EFFECTS OF DEHYDROEPIANDROSTERONE (DHEA) ON
LIPID PEROXIDATION ACTIVITY AND NITRITE OXIDE
CONCENTRATION IN THE AORTA OF MALE WISTAR RATS DUE
TO EXPOSURE OF CIGARETTE SMOKE*

**NILA RIDHAYANI
P062192002**



**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2022**

HALAMAN PENGANTAR

**PENGARUH PEMBERIAN DEHYDROEPIANDROSTERONE
(DHEA) TERHADAP AKTIVITAS PEROKSIDASI LIPID DAN
KADAR NITRIT OKSIDA PADA AORTA TIKUS WISTAR JANTAN
YANG TERPAPAR ASAP ROKOK**

Tesis

sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister

Program Studi

Ilmu Biomedik Konsentrasi Fisiologi

Disusun dan diajukan oleh

NILA RIDHAYANI
P062192002

Kepada

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2022**

TESIS

**PENGARUH PEMBERIAN DEHYDROEPIANDROSTERONE (DHEA)
TERHADAP AKTIVITAS PEROKSIDASI LIPID DAN KADAR NITRIT
OKSIDA PADA AORTA TIKUS WISTAR JANTAN YANG TERPAPAR
ASAP ROKOK**

NILA RIDHAYANI
NIM: P062192002

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka penyelesaian Studi Program Magister Ilmu Biomedik Sekolah Pascasarjana

Universitas Hasanuddin

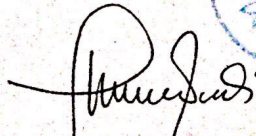
pada tanggal 15 Agustus 2022

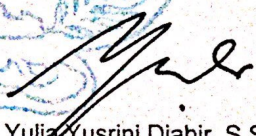
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui

Pembimbing Utama

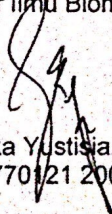
Pembimbing Pendamping

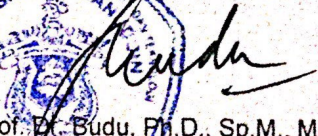

dr. M. Arsyad, M.BiomSc, Ph.D.
NIP. 19760820 2002121 003


Yulia Yusrini Djabir, S.Si., M.Si.,
M.BiomedSc., PhD. Apt.
NIP. 19780728 2002122 003

Ketua Program Studi
Magister Ilmu Biomedik

Dekan Sekolah Pascasarjana
Universitas Hasanuddin


Dr. dr. Ika Yustisia, M.Sc.
NIP. 19770121 2003122 003


Prof. Dr. Budu, Ph.D., Sp.M., MMedEd.
NIP. 19661231 1995031 009

PERNYATAAN KEASLIAN PENELITIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Nila Ridhayani
NIM : P062192002
Jurusan/Program Studi : Ilmu Biomedik Konsentrasi Fisiologi

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa tesis yang berjudul "Pengaruh Pemberian Dehydroepiandrosterone (DHEA) terhadap Aktivitas Peroksidasi Lipid dan Kadar Nitrit Oksida pada Aorta Tikus Wistar Jantan yang Terpapar Asap Rokok" adalah karya ilmiah saya sendiri dan sepanjang pengetahuan saya di dalam naskah tesis ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan/ditulis/diterbitkan sebelumnya, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila dikemudian hari ternyata di dalam naskah tesis ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur jiplakan, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 19 Agustus 2022

Yang membuat pernyataan,


Nila Ridhayani

PRAKATA

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian yang berjudul "**Pengaruh Pemberian *Dehydroepiandrosterone* (DHEA) terhadap Aktivitas Peroksidasi Lipid dan Kadar Nitrit Oksida pada Aorta Tikus Wistar Jantan yang Terpapar Asap Rokok.**" Tak lupa shalawat dan salam penulis haturkan kepada Rasulullah Shallallahu 'alaihi wa sallam yang telah membukakan pintu ilmu bagi kita semua. Tujuan penulisan tesis ini adalah sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar master di program studi magister Ilmu Biomedik konsentrasi Fisiologi, Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin.

Penyusunan tesis ini telah melalui banyak rintangan, tetapi, berkat do'a, masukan, dan bantuan dari berbagai pihak, tesis ini dapat terselesaikan dengan baik. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati penulis ingin mengucapkan rasa terima kasih kepada:

1. Kedua orang tua penulis, ayahanda Burhan Abu dan Ibunda Hasbiah, yang telah mengasuh, membesarkan, mendidik, dan memberikan semangat serta doa disetiap langkah perjalanan hidup penulis. Tak ada kata yang pantas untuk mengucapkan rasa terima kasih sebesar-besarnya kepada beliau.
1. **dr. M. Aryadi Arsyad, M. BiomedSc., Ph.D.** selaku pembimbing utama yang telah memberi banyak kontribusi besar, terutama meluangkan waktu dan tenaganya dalam membimbing dan membantu penulis serta memberikan saran dan solusi di setiap kendala-kendala yang dihadapi penulis mulai dari awal hingga akhir penulisan tesis ini.
2. Ibu **Yulia Yusrini Djabir, S.Si., M.Si., M. BiomedSc., Ph.D., Apt.** selaku dosen pembimbing yang juga memiliki kontribusi besar pada penelitian penulis, banyak memberikan saran dan solusi terhadap kendala-kendala pada penelitian penulis dari awal hingga akhir penulisan tesis ini.
3. **Dr. dr. Ika Yustisia, M.Sc.** selaku ketua program studi Ilmu Biomedik Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin dan juga selaku penguji yang telah meluangkan waktu dan memberi masukan, kritik, dan sarannya.
4. **dr. Muhammad Husni Cangara. Ph.D., Sp.PA., DFM.** dan Pak **Firzan Nainu., M. BiomedSc., Ph.D.** selaku penguji yang telah meluangkan waktunya dan bersedia memberi masukan dan saran untuk penyusunan tesis ini.

5. Bapak/Ibu dosen pascasarjana beserta Staf Sekolah Pascasarjana atas pelayanan, bantuan, dan ilmu yang telah diberikan selama penulis menempuh pendidikan di pascasarjana Universitas Hasanuddin
6. Kak Uli atas kesediannya membantu dan membimbing peneliti dalam melakukan pemeriksaan di HumRC-RS UNHAS.
7. Teman-teman angkatan 2019/2 Program Studi Ilmu Biomedik, khususnya konsentrasi Fisiologi yang bersedia membantu, bertukar pikiran, dan mendukung peneliti selama menempuh pendidikan.
8. Keluarga, kerabat, sahabat, dan teman-teman yang tidak tercantum namun banyak membantu dan memberi saran bagi penulis dalam penyelesaian tesis ini.

Penulis berharap tesis ini dapat bermanfaat bagi para pembaca, bukan hanya bagi penulis sendiri. Penulis menyadari bahwa pada tesis ini masih ada banyak kekurangan, oleh karena itu kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan untuk perbaikan tesis ini di masa mendatang.

Makassar, 15 Agustus 2022

Nilia Ridhayani

ABSTRAK

NILA RIDHAYANI. *Pengaruh Pemberian Dehydroepiandrosterone (DHEA) Terhadap Aktivitas Peroksidasi Lipid dan Kadar Nitrit Oksida pada Aorta Tikus Wistar Jantan yang Terpapar Asap Rokok (dibimbing oleh M. Aryadi Arsyad dan Yulia Yusrini Djabir)*

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian DHEA terhadap aktivitas peroksidasi lipid dan kadar nitrit oksida pada aortatikus wistar jantan yang terpapar asap rokok. Penelitian ini merupakan penelitian laboratorium dengan 21 tikus yang dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan: kontrol negatif yang diberi paparan asap rokok selama 14 hari (KN-14), DHEA-1 (dosis 15 mg/KgBB + paparan asap rokok selama 14 hari), dan kelompok DHEA-2 (dosis 30 mg/KgBB + paparan asap rokok selama 14 hari). Pemaparan asap rokok dilakukan selama 25-45 menit sebanyak 4 batang/hari. Selanjutnya dilakukan pembedahan untuk pengambilan aorta yang kemudian dilakukan pemeriksaan kadar malondialdehida (MDA) sebagai biomarker peroksidasi lipid dan juga pemeriksaan kadar nitrit oksida (NO) dengan metode *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA).

Hasil yang diperoleh menunjukkan peningkatan kadar MDA yang signifikan pada kelompok yang diberikan DHEA terutama dosis 30 mg/KgBB ($p < 0.05$). Sementara itu, pemberian DHEA dosis 15 dan 30 mg/kgBB tidak memberikan pengaruh yang signifikan ($p > 0.05$) pada kadar NO aorta bila dibandingkan dengan kelompok KN-14. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa pemberian DHEA dapat meningkatkan aktivitas peroksidasi lipid ditunjukkan dengan peningkatan kadar MDA aorta yang signifikan tanpa meningkatkan kadar NO aorta tikus yang terpapar asap rokok selama 14 hari.

Kata kunci: *dehydroepiandrosterone, MDA, NO, peroksidasi lipid, paparan asap rokok*



ABSTRACT

NILA RIDHAYANI. *The Effects of Dehydroepiandrosterone (DHEA) on Lipid Peroxidation Activity and Nitrite Oxide Concentration in The Aorta of Male Wistar Rats due to The Exposure of Cigarette Smoke* (Supervised by **M. Aryadi Arsyad** and **Yulia Yusrini Djabir**)

The research aimed to investigate the effect of dehydroepiandrosterone (DHEA) on lipid peroxidation activity and nitric oxide concentration in the aorta of male Wistar rats due to exposure to cigarette smoke. This study was a laboratory experiment using 21 rats that were divided into 3 groups: KN-14 (negative control that is given smoke exposure within 14 days), DHEA-1 (15 mg/kg BW + smoke exposure for 14 days), and DHEA-2 (30 mg/kg BW + smoke exposure for 14 days). The exposure was carried out in 25-45 minutes with 4 cigarettes/day. Surgery was performed to remove the aorta to examine malondialdehyde (MDA) as a biomarker of lipid peroxidation and nitric oxide (NO) concentration using Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).

The results showed that in the treatment group, a significant increase in MDA concentrations ($p < 0.05$) was found in the group administered with DHEA, particularly at a dose of 30 mg/kg BW. Meanwhile, the administration of DHEA at doses of 15 and 30 mg/kg BW did not have a significant effect ($p > 0.05$) on aortic NO concentrations compared to the group KN-14. Therefore, it can be concluded that the administration of DHEA could increase lipid peroxidation activity, as indicated by a significant increase in aortic MDA concentrations, without increasing aortic NO concentrations in rats exposed to cigarette smoke for 14 days.

Keyword: *dehydroepiandrosterone (DHEA), MDA, NO, lipid peroxidation, exposure of cigarettes smoke*

 GUGUS PENJAMINAN MUTU (GPM) SEKOLAH PASCASARJANA UNHAS	
Abstrak ini telah diperiksa.	Paraf Ketua / Sekretaris,
Tanggal: <u>20/07/2022</u>	
 N I L A R I D H A Y A N I	

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PENGANTAR.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN	v
PRAKATA	vi
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB I.....	1
A. LATAR BELAKANG MASALAH.....	1
B. RUMUSAN MASALAH	3
C. TUJUAN PENELITIAN.....	3
D. MANFAAT PENELITIAN.....	4
BAB II.....	5
A. ASAP ROKOK	5
B. DEHYDROEPIANDROSTERONE (DHEA)	7
1. Sintesis dan Metabolisme	7
2. Aksi Mekanisme Pada Sistem Kardiovaskular	10
3. Pengaruh Pemberian DHEA terhadap Sistem Kardiovaskular	11
C. PEROKSIDASI LIPID	13
1. Malondialdehide (MDA) sebagai Biomarker.....	14
2. Pengukuran MDA.....	14
D. NITRIT OKSIDA (NO).....	15
1. eNOS dan Disfungsi Endotelium.....	15
2. Pengukuran NO.....	19
E. HUBUNGAN ASAP ROKOK DENGAN DISFUNGSI ENDOTEL.....	21
F. KERANGKA TEORI.....	24
G. KERANGKA KONSEP	25
H. HIPOTESIS.....	26
BAB III.....	27
A. DESAIN PENELITIAN	27
B. VARIABEL PENELITIAN	28
C. WAKTU DAN TEMPAT PENELITIAN.....	28
D. POPULASI DAN SAMPEL.....	28
E. ALAT DAN BAHAN.....	29
F. PROSEDUR PENELITIAN	30
G. DEFINISI OPERASIONAL.....	33
H. IZIN PENELITIAN DAN KELAYAKAN ETIK	33
I. TEKNIK ANALISIS.....	34
J. ALUR PENELITIAN	35

BAB IV	36
A. HASIL	36
1. Karakteristik Hewan Coba.....	36
2. Hasil Analisis MDA.....	37
3. Hasil Analisis NO.....	39
B. PEMBAHASAN.....	41
C. KETERBATASAN PENELITIAN.....	47
A. KESIMPULAN.....	48
B. SARAN	48
DAFTAR PUSTAKA.....	49
LAMPIRAN.....	56
RIWAYAT HIDUP	71

DAFTAR TABEL

Tabel 2. 1. Efek rokok berdasarkan penelitian yang dilakukan pada manusia.....	7
Tabel 2. 2. Mekanisme kerja DHEA.....	10
Tabel 2. 3. Penilaian In Vivo atau Ex Vivo mode aksi DHEA/S pada sel endothelium.....	11
Tabel 2. 4. Ringkasan Perbedaan antara endothelium normal dan yang mengalami disfungsi.	19
Tabel 4. 1. Bobot badan tikus sebelum dan sesudah pada kelompok pilot study.	36
Tabel 4. 2. Bobot badan tikus sebelum dan sesudah pada kelompok perlakuan.	36

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1. Sintesis dan Metabolisme DHEA	9
Gambar 2. 2. Struktur dinding arteri.....	15
Gambar 2. 3. Nitrit oksida yang diturunkan dari endothelium: Produksi dan Tindakan biologis.....	16
Gambar 2. 4. Inisiator disfungsi endothelium (vaskular).....	17
Gambar 2. 5. Patofisiologi disfungsi endothelium.....	18
Gambar 2. 6. Efek radikal bebas pada disfungsi endothelium.....	22
Gambar 2. 7. Kerangka Teori	24
Gambar 2. 8. Kerangka Konsep	25
Gambar 3. 1. Desain Penelitian	27
Gambar 3. 2. Ilustrasi <i>Smoke Chamber</i>	31
Gambar 3. 3. Alur Penelitian.....	35
Gambar 4. 1. Diagram rata-rata kadar MDA aorta pada kelompok kontrol negatif setelah pemberian asap rokok selama 14 dan 30 hari.....	37
Gambar 4. 2. Diagram rata-rata kadar MDA aorta setelah pemberian DHEA dosis 15 mg/KgBB dan 30 mg/KgBB selama 14 hari. (*) menunjukkan perberbedaan signifikan dengan kelompok KN-14.....	38
Gambar 4. 3. Diagram rata-rata kadar NO aorta pada kelompok kontrol negatif setelah pemberian asap rokok selama 14 dan 30 hari.....	39
Gambar 4. 4. Diagram rata-rata kadar NO aorta setelah pemberian DHEA dosis 15 mg/KgBB dan 30 mg/KgBB selama 14 hari.....	40

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Rekomendasi Persetujuan Etik.....	56
Lampiran 2. Dokumentasi Penelitian	57
Lampiran 3. Tabel Data Hasil Pemeriksaan ELISA	60
Lampiran 4. Analisis Statistik	61

BAB I PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG MASALAH

Merokok merupakan hal lazim yang dilakukan diseluruh dunia terutama dikalangan pemuda dan di negara-negara berkembang (Pan et al., 2019). Merokok merupakan penyumbang radikal bebas terbesar juga penyebab penyakit kardiovaskular, morbiditas dan kematian dini terbesar di seluruh dunia (Ganesha et al., 2020; Oakes et al., 2020). Pada tahun 2019, WHO mengumumkan bahwa tembakau (dalam berbagai bentuk) dapat membunuh hingga setengah dari pengguna setiap tahunnya dan 7 juta di antaranya adalah akibat dari penggunaan tembakau secara langsung, sementara 1,2 juta kematian di antaranya secara tak langsung (bukan perokok) (Münzel et al., 2020).

Zat kimia yang dikeluarkan oleh rokok terdiri dari 85% komponen gas dan selebihnya dalam bentuk partikel (Suryana & Restuti, 2017). Asap rokok mengandung lebih dari 4 ribu sampai 9 ribu bahan yang teridentifikasi dan sebagian besar adalah produk pembakaran tembakau termasuk nikotin, amonia, akrolein, fenol, asetaldehida, hidrokarbon aromatik polisiklik, polifenol, kemudian karbon monoksida, nitrogen oksida, hidrogen sianida, logam berat (Benowitz & Burbank, 2016; Kamceva et al., 2016).

Nikotin, salah satu senyawa aktif utama asap rokok, juga telah terbukti memiliki efek buruk pada sistem kardiovaskular dan telah di dokumentasikan bahwa nikotin dengan konsentrasi yang sama dengan yang ditemukan dalam darah perokok dapat mengubah metabolisme lipid dan merusak fungsi endotel pada hewan (Liu et al., 2017). Mekanisme nikotin memicu respons sel endotel sistemik dan melibatkan peningkatan molekul pensinyalan nitrit oksida (NO) dan spesies oksigen reaktif (ROS) serta pembentukan metabolit proapoptosis, peristiwa yang juga mengganggu fungsi penghalang endotel paru (Schweitzer et al., 2015).

Rokok mengandung bahan kimia pengoksidasi seperti radikal bebas (sebanyak 10^{17} pada satu batang rokok dalam fase tar dan 10^{15} dalam fase gas), spesies oksigen reaktif, dan nitrogen oksidatif yang dianggap sebagai kontributor utama arterogenesis dan trombogenesis (Boehm et al., 2020). Pada dua fase utama ini juga kaya akan radikal bebas yang menginisiasi kerusakan oksidatif dalam bentuk peroksidasi lipid (Kamceva et al., 2016). Kerusakan oksidatif dipicu

oleh terjadinya disfungsi dan kerusakan sel endotel yang pada akhirnya akan mengurangi bioavailabilitas nitrit oksida [NO] dan menipisnya antioksidan endogen, peradangan, aktivasi trombosit, dan kelainan lipid (Benowitz & Burbank, 2016).

ROS mampu mengoksidasi membran sel yang mengandung asam lemak tak jenuh ganda (*Polyunsaturated Fatty Acid*, PUFA) dalam proses yang dikenal sebagai peroksidasi lipid yang secara langsung menyebabkan kerusakan membran sel yang merupakan awal dari berbagai penyakit juga komponen nitrogen oksida dalam asap rokok merupakan oksidan kuat yang menyebabkan peroksidasi lipid yang menghasilkan *malondialdehyde* (MDA) akibat stres oksidatif (Wahid et al., 2019). Peroksidasi lipid adalah proses autooksidasi yang dihasilkan dari reaksi langsung antara molekul lipid dan molekul oksigen (Djordjević et al., 2020).

Spesies oksigen reaktif (ROS) diproduksi oleh proses fisiologis normal dan memainkan peran penting dalam pensinyalan sel dan homeostasis jaringan (Su et al., 2019). ROS dapat berinteraksi dengan banyak molekul yang dapat mengakibatkan mutasi DNA, denaturasi protein, peroksidasi lipid, dan kerusakan pada membran (Ding et al., 2017). Akumulasi kerusakan oksidatif terhadap sel endotel dapat mengakibatkan gangguan produksi nitrit oksida dimana terjadi peningkatan degradasi nitrit oksida sehingga menurunkan ketersediaan NO dan menyebabkan penurunan pertahanan endotel, sehingga endotel mudah rusak atau mengalami disfungsi (Suryana & Restuti, 2017).

Dehydroepiandrosterone (DHEA) beserta sulfate esternya (DHEAS) adalah hormon steroid sirkulasi yang paling melimpah dan sebagian besar disekresikan oleh zona reticularis korteks adrenal, gonad, serta otak. DHEA dan DHEA-S mampu melakukan banyak peran dalam tubuh manusia seperti pada tindakan biologis yaitu perlindungan saraf, pertumbuhan neurit, dan efek antagonis pada oksidan dan glukokortikoid, serta efek metabolik seperti modulasi imun dan antikanker (Tang et al., 2022).

Telah dilaporkan dalam banyak penelitian *in vitro* dan *in vivo* bahwa DHEA menimbulkan efek yang menguntungkan pada tingkat spesies oksigen reaktif (ROS), sistem pertahanan antioksidan dan kerusakan oksidatif dalam sel dimana sifat antioksidan DHEA ini dapat dihasilkan dari kemampuannya untuk mengkelat logam atau peningkatan aktivitas enzim antioksidan (Kiersztan et al., 2021).

DHEA juga dapat digunakan untuk mengaktifkan saluran kalium melalui aktivasi *guanylate cyclase* yang larut dan meningkatkan fungsi endotel melalui peningkatan sintesis nitrit oksida (NO) untuk pelebaran arteri dan memblokir vasokonstriksi yang diinduksi hipoksia. Melalui mekanisme yang diprakarsai oleh membran plasma, DHEA secara akut meningkatkan pelepasan NO dari sel-sel endotel vaskular yang utuh (El-Sakka, 2018).

DHEA juga digunakan sebagai suplemen tetapi penelitian pemberian suplementasi DHEA secara eksogen berkaitan dengan kardiovaskular belum banyak dilakukan dan atas dasar inilah pada penelitian ini peneliti akan mengeksplorasi efek pemberian *dehydroepiandrosterone* (DHEA) pada aktivitas peroksidasi lipid dan kadar nitrit oksida pada aorta tikus wistar jantan yang terpapar asap rokok.

B. RUMUSAN MASALAH

Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan, maka rumusan masalah yang diangkat dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bagaimanakah pengaruh pemberian *dehydroepiandrosterone* (DHEA) terhadap aktivitas peroksidasi lipid pada aorta tikus wistar jantan yang terpapar asap rokok?
2. Bagaimana pengatuh pemberian *dehydroepiandrosterone* (DHEA) terhadap kadar nitrit oksida pada aorta tikus wistar jantan yang terpapar asap rokok?

C. TUJUAN PENELITIAN

Berdasarkan rumusan masalah diatas, maka tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut

1. Tujuan Umum
Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh *dehydroepiandrosterone* (DHEA) pada aorta tikus wistar jantan yang terpapar asap rokok.
2. Tujuan Khusus
 - a. Untuk mengetahui bagaimana pengaruh pemberian dari *dehydroepiandrosterone* (DHEA) terhadap kadar *malondialdehyde* (MDA) pada aorta tikus wistar jantan yang terpapar asap rokok.
 - b. Untuk mengetahui bagaimana pengaruh pemberian dari *dehydroepiandrosterone* (DHEA) terhadap kadar nitrit oksida (NO) pada aorta tikus wistar jantan yang terpapar asap rokok.

D. MANFAAT PENELITIAN

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat dari berbagai aspek bagi semua pihak yang terlibat baik masyarakat, mahasiswa, dan peneliti lainnya.

1. Manfaat Pengembangan Ilmu

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi sumber informasi ilmiah, wawasan serta pengetahuan baik bagi penulis, mahasiswa, dan masyarakat dalam memahami pengaruh pemberian *dehydroepiandrosterone* (DHEA) terhadap aktivitas peroksidasi lipid dan kadar nitrit oksida pada aorta tikus wistar jantan yang terpapar asap rokok.

2. Manfaat Praktis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai bahan referensi dan sebagai data awal penelitian selanjutnya mengenai pengaruh pemberian *dehydroepiandrosterone* (DHEA) terhadap aktivitas peroksidasi lipid dan kadar nitrit oksida pada jaringan aorta tikus wistar jantan yang terpapar asap rokok.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. ASAP ROKOK

Tembakau masih merupakan salah satu penyebab kematian dini terbanyak di dunia meskipun berbagai kebijakan telah dilakukan untuk mendorong penghentian penggunaan rokok, jumlah perokok global secara absolut telah meningkat seiring dengan pertumbuhan penduduk (Liu et al., 2017). Menurut Pusat Pengendalian dan Pencegahan Penyakit (CDC), data terbaru mereka menunjukkan bahwa 20,8% dari populasi orang dewasa di AS menggunakan rokok (Pan et al., 2019). Menurut laporan epidemiologi tembakau WHO tahun 2011, merokok menyebabkan sekitar 6 juta kematian setiap tahun, dengan sekitar sepertiga dari kematian ini disebabkan oleh komplikasi jantung atau serebrovaskular juga pada studi epidemiologi memberikan bukti bahwa merokok memiliki keterkaitan besar dengan penyakit kardiovaskular juga merupakan faktor risiko utama terjadinya hipertensi dan penyakit jantung coroner (Meza et al., 2019).

Sebagai tanaman, tembakau mengakumulasi logam dari tanah tempatnya tumbuh dimana banyak logam yang berbeda telah ditemukan dalam daun tembakau dan asap. Logam berat diketahui sebagai racun dengan beragam implikasi kesehatan seperti mempromosikan kanker, peradangan, penyakit kardiovaskular dan paru-paru, serta gangguan kemampuan kognitif. Materi partikulat (PM) adalah istilah umum yang digunakan untuk menggambarkan semua partikel padat dan tetesan cairan yang tersuspensi di udara. Ada banyak mekanisme yang berbeda dari toksisitas yang disebabkan oleh partikel dan secara umum dapat dibagi menjadi langsung dan tidak langsung. Efek langsung ke sistem kardiovaskular terutama berasal dari generasi stres oksidatif dan gangguan saluran ion sedangkan efek tidak langsung sebagian besar diwujudkan melalui peradangan dan materi partikulat juga telah dilaporkan menyebabkan disfungsi endotel vascular (Münzel et al., 2020).

Nikotin dalam asap rokok digolongkan sebagai alkaloid (seperti morfin dan kokain) dan memenuhi kriteria obat yang sangat adiktif dimana alkaloid ini diketahui dapat merangsang sistem saraf pusat juga meningkatkan tekanan darah dan detak jantung (Münzel et al., 2020; Salvi, 2014). Nikotin yang terdapat dalam daun tembakau memiliki konsentrasi yang bervariasi tergantung pada jenis varietas

daun tembakau yang digunakan, contohnya varietas cerah yang awalnya ditanam di Virginia, Amerika Serikat, mengandung 2,5 - 3% nikotin, sedangkan tembakau jenis burley mengandung 3,5 - 4% nikotin dan jenis tembakau oriental mengandung kurang dari 2% nikotin (Salvi, 2014).

Sebagai obat adiktif, nikotin memiliki 2 efek yang sangat kuat yaitu stimulan dan juga depresan dimana nikotin menderegulasi fungsi otonom jantung, meningkatkan aktivasi simpatis, meningkatkan denyut jantung, menyebabkan vasokonstriksi koroner dan perifer, meningkatkan beban kerja miokard, dan merangsang pelepasan katekolamin adrenal dan saraf, juga nikotin dikaitkan dengan resistensi insulin, peningkatan kadar lipid serum, dan peradangan intravaskular yang berkontribusi terhadap perkembangan aterosklerosis (Papathanasiou et al., 2014). Aktivitas nikotin pada saat merokok, menyebabkan peningkatan sekresi adrenalin, menyebabkan peningkatan jangka pendek dalam tekanan arteri dan detak jantung, sebagai efek respons vasospastik terhadap stimulasi sistem adrenergic (Mieczkowska et al., 2012).

Saat rokok dinyalakan maka rokok akan menguap dan nikotin menempel pada tetesan kecil dalam asap tembakau yang dihirup oleh perokok, dan untuk kerusakan yang terjadi pada paru-paru perokok tembakau terutama dimediasi oleh tar yang ada dalam asap sedangkan nikotin relatif tidak berbahaya. Menurut arahan Uni Eropa, batas atas tar, nikotin, dan karbon monoksida telah ditetapkan masing-masing pada 10 mg, 1 mg, dan 10 mg serta jenis kertas yang digunakan dalam rokok menentukan jumlah tar dan nikotin yang akan dikirim ke paru-paru dimana menggunakan lebih banyak kertas berpori akan membiarkan lebih banyak udara masuk ke dalam rokok, mengencerkan asap dan mengurangi jumlah tar dan nikotin yang masuk ke paru-paru (Salvi, 2014).

Bahan kimia organik beracun dalam asap rokok termasuk hidrokarbon aromatic polisiklik (PAH), nitrosamin dan aldehida reaktif seperti akrolein, formaldehida, dan asetaldehida. PAH dan nitrosamin dikenal sebagai karsinogen dan telah dikaitkan dengan banyak komplikasi lain termasuk CVD dan mempercepat aterosklerosis pada beberapa model hewan, hidrokarbon aromatic polisiklik (PAH) berasal dari pembakaran bahan organik yang tidak sempurna dan jumlah PAH tertinggi dihasilkan dari *side-stream* rokok tembakau (ujung rokok yang terbakar) dan aldehida membentuk spesies oksigen reaktif (ROS). Aldehida penting lainnya adalah acrolein yang memiliki struktur kimia (ikatan rangkap) yang membuatnya lebih reaktif daripada aldehida lain dan, sebagai akibatnya, dapat

menginduksi stres oksidatif dan disfungsi retikulum endoplasma/mitokondria, dan peradangan (Benowitz & Burbank, 2016; Münzel et al., 2020).

Asap rokok terdiri dari aerosol partikulat yang dibawa dalam fase gas yang Ketika dihirup dapat menyebabkan cedera oksidatif, peradangan pembuluh darah, aktivasi trombosit, peningkatan viskositas darah, dan perubahan fungsi otonom jantung. Logam yang berpotensi kardi toksik dalam asap tembakau termasuk timbal, kadmium, dan arsenik. Logam dapat mengoksidasi protein intraseluler, pengendapannya dalam serum dan dinding aorta berkontribusi terhadap kerusakan endotel (Benowitz & Burbank, 2016).

Tabel 2. 1. Efek rokok berdasarkan penelitian yang dilakukan pada manusia.

Bahan Toksik Utama Rokok	Marker Kerusakan
Logam transisi, Karbon Monoksida, Aldehida, Nikotin, N-nitrosamin, Partikulat Padat, VOCs, PAHs	Stres Oksidatif: TBAR Serum, 3-NT, oxLDL, Isoprostan ↑ Aktivasi NOX seluler dan ROS ↑ NOX-2 Aorta ↑, ROS ↑, Pelepasan eNOS, Penipisan BH4, mtROS kardiak ↑, gangguan sirtuin-3 Inflamasi: IL-1β ↑, IL-6, TNF-α ↑, iNOS, CRP, WBCs ↑ Vcam1 Aorta, Icam1, Mcp1, p22phox ↑ Thrombosis: Fibrinogen, d-dimer ↑ Kerusakan DNA: Metilguanin ↑ γ-hidroksi-propano-deoksiguanosin ↑ 8-hidroksi-2'-deoksiguanosin ↑

Sumber: Münzel et al. (2020)

B. DEHYDROEPIANDROSTERONE (DHEA)

1. Sintesis dan Metabolisme

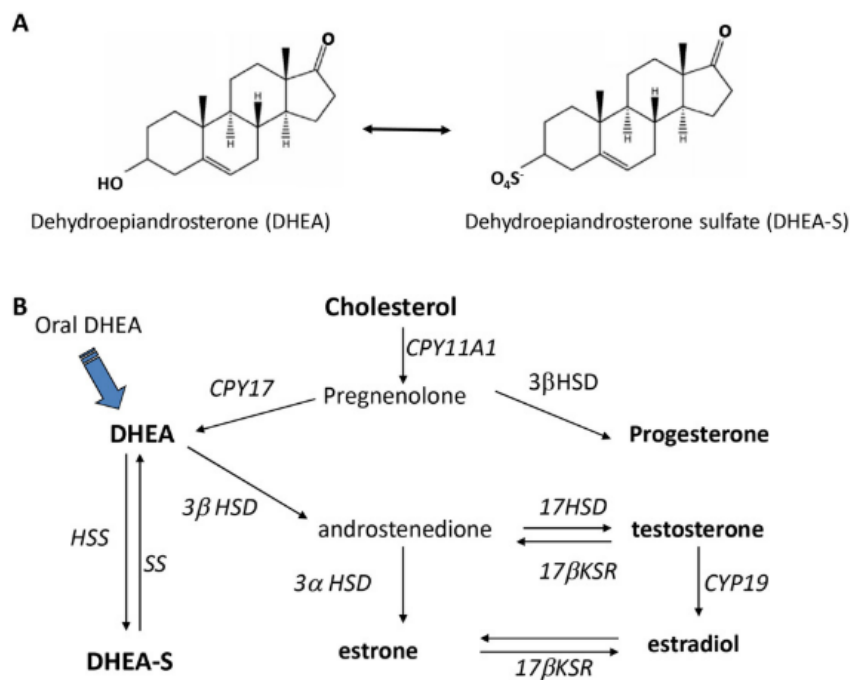
Dehydroepiandrosterone, 3β-hidroksil-5-androsteron-17-one, DHEA adalah steroid adrenal C-19 alami yang berasal dari kolesterol yang disekresikan oleh kelenjar adrenal (J. Savineau et al., 2015). DHEA juga disekresikan oleh gonad, otak dan saluran pencernaan (Prough et al., 2016). DHEA adalah steroid adrenal paling melimpah pada manusia dengan konsentrasi serum ester 3β-sulfatnya (DHEA-S) kira-kira 20 kali lipat lebih tinggi dibandingkan hormon steroid lain yang bersirkulasi (Dumas De La Roque et al., 2013).

DHEA dan DHEA-S adalah prekursor dalam biosintesis androgen dan dimetabolisme langsung menjadi androstenedione, testosteron dan estrogen dimana DHEA-S menyediakan 50% androgen pada pria dan 75% estrogen pada wanita pramenopause. Selain menyediakan prekursor untuk steroid seks, DHEA berikatan langsung dengan hormon steroid dan reseptor nuklir (NRs), mengaktifkan berbagai reseptor membran dan menghambat gerbang tegangan tipe-T saluran Ca^{2+} (Prough et al., 2016).

Kadar DHEA-S dalam darah sangat tinggi saat lahir dan turun drastis mendekati nol pada usia sekitar enam bulan, kemudian meningkat ke nilai puncak pada pria sekitar usia 25 tahun dan akhirnya mengalami penurunan tajam yang progresif seiring bertambahnya usia (Austin et al., 2013).

DHEA adalah steroid yang paling utama diproduksi di zona reticularis kelenjar adrenal sebagai respons terhadap hormon adrenokortikotropik (ACTH) dan konsentrasi DHEA memuncak sekitar usia 20 dan kemudian terus menurun seiring bertambahnya usia. DHEA kemudian dimetabolisme menjadi 5-androsten- $3\beta,17\beta$ -diol, 4-androsten-3,17-dione, testosteron, estrogen, dan steroid biologis aktif lainnya, tergantung pada jaringan (J. Savineau et al., 2015).

Sintesis DHEA dikendalikan oleh pensinyalan hormonal dari sumbu hipotalamus-hipofisis-adrenal. Hormon pelepas kortikotropin yang dilepaskan dari hipotalamus merangsang hipofisis anterior untuk mensintesis dan mensekresi hormon ACTH, dimana ACTH berikatan dengan melanocortin-2 plasma membrane (PM) G-protein-coupled receptors (GPCRs) yang terletak di sel adrenokortikal dan mengaktifkan pensinyalan yang bergantung pada protein kinase A (PKA) yang bergantung pada cAMP, yang selanjutnya pensinyalan PKA dengan cepat meningkatkan STAR untuk pengiriman kolesterol ke mitokondria dan meningkatkan ekspresi gen STAR, CYP11A1 dan CYP17A1 untuk mempertahankan peningkatan output steroid (Prough et al., 2016).



Gambar 2. 1. Sintesis dan Metabolisme DHEA. (A) Struktur kimia DHEA (3 β -hidroksi-5-androsten-17-satu) dan turunan sulfokonjugasinya DHEA-S. DHEA-S dapat diinterkonversi dengan DHEA oleh DHEA sulfatase dan sulfotransferase. (B) DHEA berasal dari kolesterol dan pregnenolone. DHEA kemudian dimetabolisme menjadi 5-androsten-3 β ,17 β -diol, 4-androsten-3,17-dione, testosteron, estrogen. Enzim yang terlibat adalah: CPY11A1; CPY 17 (liase atau 17 α -hidroksilase); CYP 19 (aromatase); 3 α atau β -HSD (3 α atau β -hidroksisteroid dehidrogenase); 17 β HSD (17 β -hidroksisteroid dehidrogenase); 17 β -KSR (17 β -ketosteroid reduktase); HSS (hidroksisteroid sulfotransferase); SS (sterol sulfatase) (J.-P. Savineau et al., 2013).

Metabolisme DHEA menjadi androgen aktif, termasuk testosteron dan 5-dihidrotestosteron (DHT), terjadi di gonad, hati, adrenal, dan jaringan perifer. Pada pria dengan fungsi testis normal, kontribusi DHEA terhadap testosteron yang bersirkulasi mewakili sebagian kecil $\leq 5\%$ dari total testosteron sementara metabolisme perifer DHEA-S menghasilkan 40-75% testosteron pada wanita pramenopause sedangkan 90% estrogen pada wanita pascamenopause. Baik pria maupun wanita, DHT dan testosteron dapat dimetabolisme masing-masing menjadi estradiol (E2) atau estrone oleh aromatase (CYP19A1) (Prough et al., 2016).

2. Aksi Mekanisme Pada Sistem Kardiovaskular

Berdasarkan J.-P. Savineau et al. (2013), DHEA memiliki mekanisme kerja yang berbeda-beda dalam system kardivaskular.

Tabel 2. 2. Mekanisme kerja DHEA.

Jalur Pensinyalan	Tipe Jaringan/Sel	Peran DHEA
Fosforilasi eNos/Produksi NO (+)	Sel endotelium	Mencegah disfungsi endotelium
Stres Oksidatif (-)	Sel endotelium dan sel jantung	Mencegah kerusakan oksidatif pada sistem kardiovaskular
Akt/GSK3- β /NFAT (-)	Sel endotelium dan sel otot polos pada pembuluh darah	Efek <i>anti vascular remodeling</i>
Src/STAT3 (-)	Sel otot polos pada arteri pulmonal	Efek <i>anti vascular remodeling</i>
Kanal ion		
BK _{Ca} (+)	Sel otot polos pada arteri pulmonal	Hiperpolarisasi membran dan vasorelaksasi
Kanal Ca Tipe T (-)		Mencegah terjadinya hipertensi pulmonal
RhoA/RhoA kinase (-)	Sel otot polos pada arteri pulmonal	Mencegah terjadinya hipertensi pulmonal
(HIF-1 α) (-)	Sel otot polos pada arteri pulmonal	Mencegah hipertensi pulmonal
s/cGMP (+)	Sel otot polos pada arteri pulmonal	Mencegah hipertensi pulmonal
Reseptor DHEA		
Terkait Plasma Membran (+)	Sel endotelium dan Sel otot polos pada arteri pulmonal	Produksi vasorelaksasi NO
Reseptor hormon sitosol / nuclear (+)	Sel endotelium dan sel otot polos pada pembuluh darah	Efek <i>anti vascular remodeling</i>
Membran retikulum endoplasma terkait reseptor Sigma-1 (+)	Sel jantung	Proteksi terhadap cedera jantung dan hipertensi

(-), (+) menunjukkan tindakan pengaktifan atau penghambatan DHEA

3. Pengaruh Pemberian DHEA terhadap Sistem Kardiovaskular

Pengamatan epidemiologis dan percobaan pada hewan menunjukkan bahwa DHEA memiliki berbagai macam efek biologis dan fisiologis yang bermanfaat termasuk pencegahan obesitas, diabetes, kanker dan penyakit kardiovaskular (Austin et al., 2013), serta anti karsinogenik jika diberikan pada mencit dan tikus (Abdelazeim, Shehata, & Aly, 2020). Banyak penelitian telah melaporkan bahwa DHEA memiliki efek antioksidan dalam berbagai percobaan stres oksidatif akut dan kronis (Ding et al., 2017). Efek DHEA pada perlindungan terhadap stres oksidatif bisa melalui jalur genomik dan non-genomik (Jacob et al., 2008). Pemberian DHEA secara eksogen dapat memberikan efek ganda baik bersifat antioksidan maupun pro-oksidan, tergantung pada dosis yang diberikan dan jaringan spesifik (Ding et al., 2017).

DHEA-S memiliki efek imunomodulasi dan anti-inflamasi yang penting pada hewan dan manusia (Kasperska-zajac, 2010). DHEA menghambat kontraksi otot polos saluran napas yang ditimbulkan oleh spasmogen atau alergen. DHEA juga menekan respons alergi in vivo dan perkembangan hiper responsivitas saluran napas yang diinduksi oleh peradangan saluran napas alergi pada hewan (Bosse, 2014).

Beberapa efek DHEA (dan tidak selalu ditiru oleh DHEA-S) pada endotelium telah banyak juga banyak dijelaskan oleh Mannic et al. (2015).

Tabel 2. 3. Penilaian In Vivo atau Ex Vivo mode aksi DHEA/S pada sel endothelium.

Jaringan Target/Sel (Spesies)	Respon Biologis Makroskopik terhadap DHEA (S)	Reseptor Terlibat (Messenger)	Jalur Pensinyalan Seluler atau Mekanisme Molekuler Disarankan
Arteri Koroner (Manusia)	Penghambatan adhesi monosit	AR dan ER (melalui testosteron atau estradiol)	Peningkatan ekspresi polisialilasi NCAM
Vena umbilikal/HUVEC (manusia)	Penghambatan adhesi monosit dan peradangan yang diinduksi TNF α	N/D	Penghambatan translokasi NFk B, pengurangan ekspresi ICAM-1 dan E-selectin, pengurangan produksi ROS
Vena umbilikal/HUVEC (manusia)	Pencegahan adhesi monosit yang	N/D	Penghambatan translokasi NFkB dan ekspresi molekul adhesi,

	disebabkan oleh glukosa tinggi		sifat antioksidan DHEA (S)
Aorta (Manusia)	Penghambatan peradangan yang diinduksi TNF α	PPAR α	Penurunan ekspresi IL-8, ICAM-1 dan VCAM-1, penghambatan translokasi NF κ B
Vena umbilikalis/HUVEC (manusia)	Penghambatan proliferasi sel	TIDAK melalui AR atau ER (bukan DHEA-S)	N/D
Aorta (sapi) dan HUVEC (manusia)	Meningkatkan proliferasi sel dan perlindungan terhadap cedera superoksida	TIDAK melalui AR atau ER	Sifat antioksidan DHEA (S), peningkatan ekspresi ERK 1, 2, dan eNOS
Aorta (sapi) dan HUVEC (manusia)	Meningkatkan pelepasan NO	TIDAK melalui GPCR permukaan sel ER	Aktivasi NOS melalui jalur sensitif toksin akut (non-genomik) dan Pertusis
Aorta (Tikus)	Pemeliharaan fungsi endotel pada stenosis aorta	Sigma-1R	Fosforilasi dan ekspresi Akt dan eNOS, penghambatan downregulasi Sig-1R

Berbagai penelitian juga telah menunjukkan bahwa pemberian DHEA meningkatkan fungsi endotel vaskular melalui mekanisme non-AR dan ER-dimediati dimana DHEA meningkatkan proliferasi endotel in vitro serta melindungi sel endotelium terhadap apoptosis, DHEA juga melindungi sel-sel dari kerusakan apoptosis akibat dari paparan testotestosterone yang diinduksi yang diinduksi umur necrosis factor- α (TNF α) pada sel endotelium manusia yang dikultur. DHEA (pada konsentrasi fisiologis, 5-50 nM) meningkatkan pertumbuhan dan kelangsungan hidup sel endotelium manusia yang dikultur setelah cedera, terlepas dari keberadaan flutamide penghambat AR, yang menunjukkan tindakan independen AR. Efek DHEA juga telah diobservasi pada jalur pensinyalan NO yang diturunkan dari endotel dan merupakan mediator kunci dalam fungsi vascular dimana DHEA juga secara langsung merangsang fosforilasi eNOS di sel endothelium. Selama proses penuaan pada tikus, ekspresi eNOS dan produksi NO dan cGMP di aorta

lebih rendah dan suplementasi DHEA (1 mg/kg) dapat memperbaiki jalur sinyal terkait NO di dinding pembuluh darah. Pemberian DHEA selama 3 minggu pada tikus yang juga terbukti dalam mengurangi tekanan darah sistolik dan diastolic serta mengoreksi respon vaskular (aorta) pada tikus yang diovariectomi dan efek ini tampaknya terkait dengan peningkatan fosforilasi eNOS (J.-P. Savineau et al., 2013).

C. PEROKSIDASI LIPID

Stres oksidatif adalah keadaan terganggunya keseimbangan antara produksi spesies oksigen reaktif (ROS) dan efisiensi antioksidan. Ada sumber ROS endogen dan eksogen. ROS adalah molekul yang sangat reaktif yang diproduksi oleh organisme hidup sebagai hasil metabolisme sel normal dan faktor lingkungan dan dapat merusak asam nukleat, lipid, dan protein, sehingga mengubah fungsinya. Sumber endogen ROS adalah sel inflamasi, mitokondria, dan peroksisom (Jelic et al., 2021).

Peningkatan ROS menyebabkan ketidakseimbangan oksidan dan antioksidan dalam tubuh yang menyebabkan stres oksidatif dan sangat potensial menyebabkan kerusakan sel. Radikal bebas bereaksi dengan lemak, protein, dan asam nukleat seluler, sehingga menimbulkan kerusakan lokal dan disfungsi organ. Stres oksidatif menginduksi peroksidasi membran lipid sehingga dapat menimbulkan kerusakan yang akan menyebabkan perubahan struktur biologis kadar cairan membran, serta dapat menonaktifkan ikatan membran dengan reseptor atau enzim yang dapat mengganggu fungsi normal sel (Ganesha et al., 2020).

Membran sel atau membrane organel terdiri dari asam lemak tak jenuh ganda (PUFA) yang tinggi sehingga sangat rentan terhadap kerusakan yang diakibatkan oleh ROS yang pada prosesnya disebut dengan peroksidasi lipid. Peroksidasi Lipid adalah proses dimana radikal bebas seperti radikal oksil, radikal peroksil, dan radikal hidroksil menghilangkan elektron dari lipid dan selanjutnya menghasilkan intermediet reaktif yang dapat menjalani reaksi lebih lanjut. Produk reaksi berantai peroksidasi lipid menghancurkan DNA, protein, dan aktivitas enzim serta bertindak sebagai molekul untuk mengaktifkan jalur pensinyalan yang memulai kematian sel (Su et al., 2019).

1. Malondialdehyde (MDA) sebagai Biomarker

Malondialdehid (MDA) adalah salah satu aldehida yang paling melimpah yang dihasilkan selama oksidasi lipid sekunder dan juga mungkin yang paling umum digunakan sebagai penanda oksidasi (Reitznerová et al., 2017). MDA biologis dapat dikategorikan dalam dua bentuk yaitu bebas atau terikat secara kovalen dengan/terkonjugasi dengan protein, asam nukleat, lipoprotein dan asam amino tertentu. MDA yang bersirkulasi adalah salah satu biomarker stres oksidatif yang paling umum dan banyak digunakan. Stres oksidatif umumnya dianggap sebagai penyumbang utama berbagai penyakit seperti kanker, diabetes, asma, aterosklerosis, dan penyakit Alzheimer dan Parkinson (Tsikas, 2017).

MDA memiliki efek untuk menginduksi stres oksidatif intraseluler, menyebabkan lesi membran pada eritrosit, dan MDA juga bersifat genotoksik, bereaksi dengan DNA untuk membentuk produk tambahan yang sangat mutagenik dalam sel manusia. MDA adalah molekul yang sangat beracun dan mampu mengganggu banyak proses fisiologis pada hewan dan manusia. Selain itu, kadar MDA dalam organisme hidup telah ditemukan dimodifikasi secara signifikan dalam banyak situasi patologis (misalnya, kanker lambung, paru-paru, atau payudara, dan penyakit aterosklerotik atau kardiovaskular). Di antara berbagai senyawa karbonil yang dihasilkan sebagai produk oksidasi lipid sekunder, malondialdehid telah mendapat perhatian khusus karena potensi risiko kesehatannya, untuk efek mutagenik dan karsinogenik dari MDA (Reitznerová et al., 2017).

2. Pengukuran MDA

Berbagai metode telah diterapkan untuk pengukuran radikal oksigen dan efek merusaknya pada lipid membran. Hidroperoksida, produk utama peroksidasi lipid, tidak stabil yang mungkin termasuk hidroperoksida fosfolipid. Metode deteksi HPLC-chemiluminescence (HPLC-CL) telah dikembangkan dimana spesies ini dapat diukur. Produk aldehida utama dari peroksidasi lipid adalah spesies 3-karbon dialdehid malondialdehid (MDA) dan 4-hidroksi-2-nonenal (HNE). MDA dapat diukur dengan uji asam tiobarbiturat (TBA) menggunakan spektrofotometri UV/tampak. Sebuah *immunoassay alternatif* (ELISA) untuk 8-isoprostaglandin F_{2α} dalam jaringan biologis disediakan (Su et al., 2019).

Meskipun 8-iso-PGF_{2α} dapat diukur secara sensitif dengan kromatografi gas yang dikombinasikan dengan deteksi spektrometri massa, namun dapat lebih mudah diperiksa menggunakan kit immunoassay yang tersedia secara komersial. Metode HPLC dan ELISA merupakan metode yang memiliki spesifisitas dan

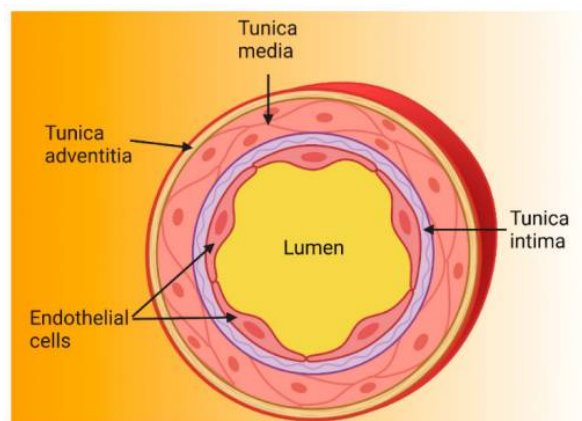
sensitivitas yang lebih baik dibandingkan dengan metode TBARS karena cara kerja yang relative lebih mudah dan cepat meskipun agak lebih mahal serta pengerjaannya harus dilakukan atau didampingi dengan seorang ahli di laboratorium (Anggraeni et al., 2017; D. Hall & K. Andrus, 2000).

D. NITRIT OKSIDA (NO)

1. eNOS dan Disfungsi Endotelium

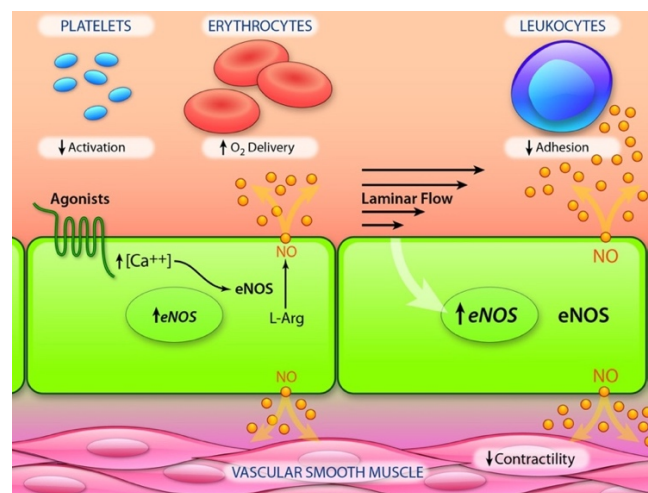
Istilah endotelium diciptakan pada tahun 1865 oleh ahli anatomi Wilhelm His, yaitu sebagai lapisan sel pembuluh darah, limfatik, dan rongga berlapis mesothelial kemudian definisi ini kemudian diubah dimana bagian endotelium juga termasuk lapisan sel dalam pembuluh darah itu sendiri dan limfatik (J.-P. Savineau et al., 2013).

Struktur anatomi endotel sangat sederhana dan linier: satu lapisan sel mesenkim (Liu et al., 2017). Endotelium dibentuk oleh satu lapisan sel endotel yang terletak di lapisan intima arteri. Selama bertahun-tahun, endotelium dianggap sebagai penghalang sederhana yang membatasi dinding pembuluh darah, tetapi saat ini diketahui memainkan peran penting dalam fisiologi dan patofisiologi kardiovaskular dengan mengatur tonus pembuluh darah, koagulasi, pertukaran cairan dan zat terlarut, peradangan, dan angiogenesis (Medina-Leyte et al., 2021).



Gambar 2. 2. Struktur dinding arteri. Dinding arteri memiliki dinding yang lebih tebal daripada pembuluh darah lainnya dikarenakan arteri memasok darah ke jaringan dan memiliki tekanan yang tinggi. Dinding arteri terdiri dari tiga lapisan: tunika intima adalah lapisan terdalam dan terdiri dari sel-sel endotel yang melekat pada lamina basal (jaringan ikat); tunika media mengandung sel otot polos pembuluh darah dan mengatur tonus pembuluh darah; dan tunika adventitia adalah yang terluar dan mengandung ujung saraf, jaringan adiposa perivaskular, dan jaringan ikat (Medina-Leyte et al., 2021).

Endotel vaskular adalah organ endokrin aktif yang terlibat dalam regulasi tonus vaskular dan pemeliharaan homeostasis vaskular (Meza et al., 2019). Endotelium menjalankan fungsinya dalam mempertahankan homeostasis vaskular melalui pelepasan sejumlah zat autokrin dan parakrin secara seimbang sebagai respons terhadap rangsangan fisik, biologis, dan kimiawi (Favero et al., 2014). Endotelium sangat penting dalam regulasi tonus vaskular, inflamasi, pertumbuhan vaskular, agregasi trombosit, dan koagulasi. Endotelium menghasilkan vasodilator penting dengan sifat anti aterosklerotik dan antiagregasi seperti nitrit oksida (\bullet NO) dan prostasiklin (Münzel et al., 2020). Endotel yang utuh berperan sebagai pelindung pada pembuluh darah yang dipicu oleh rangsangan fisiologis seperti tegangan geser yang diberikan oleh aliran darah terhadap sel endotel, menghasilkan produksi nitrit oksida (NO) yang fungsinya untuk menjaga pembuluh darah dalam keadaan vasodilatasi konstan, selain itu NO juga berfungsi menghambat terjadinya agregasi platelet, inflamasi, stress oksidatif, migrasi dan proliferasi otot polos pembuluh darah serta adhesi leukosit (Kurniawan & Yanni, 2020; Teixeira et al., 2014). Sebaliknya, endotelin-1 (ET-1) memiliki efek berlawanan dengan NO, dengan aksi vasokonstriktornya (Teixeira et al., 2014).

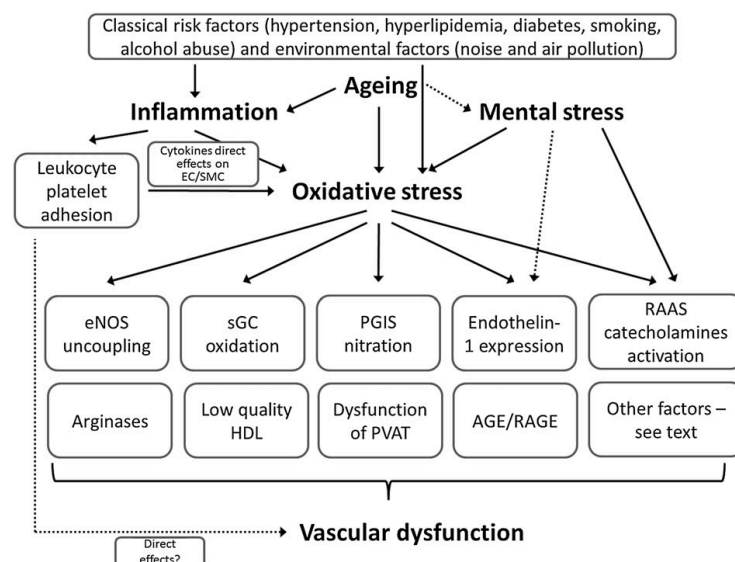


Gambar 2. 3. Nitrit oksida yang diturunkan dari endothelium: Produksi dan Tindakan biologis. Sel endotel dengan cepat menghasilkan nitrit oksida (NO) melalui isoform unik dari nitric oxide synthase (eNOS) sebagai respons terhadap agonis (misalnya, asetilkolin, bradikinin) dan fluktuasi aliran darah. Setelah dihasilkan, NO dengan cepat berdifusi melalui membran plasma endotel untuk mengaktifkan guanylate cyclase di beberapa jenis sel yang ada dalam darah (trombosit, leukosit) dan juga di dalam dinding pembuluh darah (otot polos). Aktivasi guanylate cyclase dalam hasil trombosit dalam penghambatan aktivasi, adhesi dan agregasi; pada leukosit, penurunan daya rekat; dalam sel otot polos, defosforilasi rantai ringan miosin dan vasorelaksasi. NO juga bereaksi dengan hemoglobin dalam eritrosit, meningkatkan pengiriman oksigen ke jaringan. Paparan kronis sel endotel ke aliran laminar menghasilkan peningkatan transkripsi eNOS, sehingga meningkatkan kapasitas pembentukan NO mereka (Gimbrone & García-Cardeña, 2016).

Disfungsi endotel dimanifestasikan pada gangguan relaksasi yang bergantung pada endotel yang dimediasi oleh nitrit oksida (NO) (Mieczkowska et al., 2012). Disfungsi endotel adalah korelasi klinis pertama dari aterosklerosis yang diidentifikasi karena sebagian besar penyakit kardiovaskular terkait atau merupakan konsekuensi langsung dari aterosklerosis (Daiber et al., 2017).

Disfungsi endotel juga mengganggu mekanisme regulasi homeostasis vaskular yang menyebabkan dinding pembuluh darah mengalami vasokonstriksi, adhesi leukosit, aktivasi trombosit, stres oksidatif, koagulasi, dan peradangan sehingga menyebabkan patogenesis penyakit kardiovaskular (Favero et al., 2014).

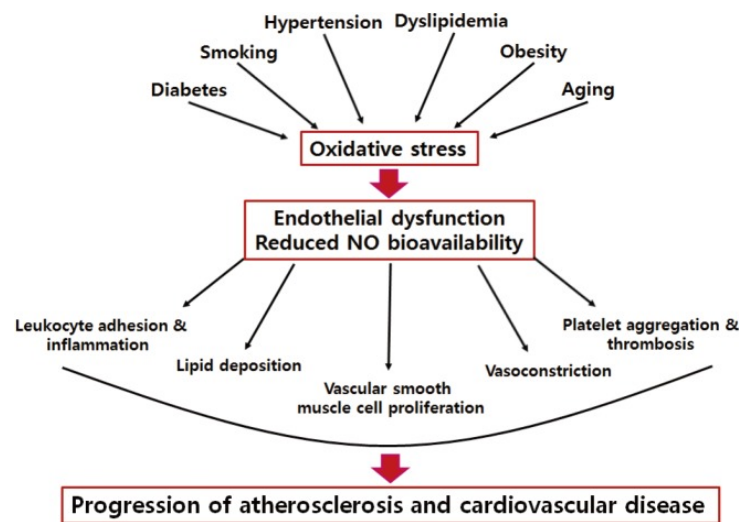
Disfungsi endotel juga ditandai dengan berkurangnya ketersediaan hayati nitrit oksida (NO). Dalam sel endotel, NO adalah gas radikal bebas yang dihasilkan dari metabolisme L-arginin oleh NO sintase endotel (eNOS). Penentu penting dari aktivitas eNOS adalah ketersediaan tetrahydrobiopterin (BH₄). Defisiensi BH₄ dalam melepaskan eNOS akan menghasilkan superoksida daripada NO (J. Li et al., 2018).



Gambar 2. 4. Inisiator disfungsi endothelium (vaskular) (Daiber et al., 2017).

Sel endotel adalah target utama sitokin inflamasi yang dilepaskan dari berbagai sel kekebalan dan sel vaskular. Telah terbukti bahwa sitokin inflamasi, seperti *tumor necrosis factor* (TNF) α , berinteraksi dengan sel endotel atau sel otot polos pembuluh darah untuk menginduksi disfungsi nitrit oksida endotel, produksi spesies oksigen reaktif (ROS) dan proliferasi sel otot polos pembuluh darah, yang

mengakibatkan disfungsi endotel dan promosi penyakit kardiovaskular (Park & Park, 2015). Paparan kronis terhadap faktor risiko kardiovaskular dan stres oksidatif membanjiri mekanisme pertahanan endotel vaskular, yang diikuti oleh disfungsi endotel dan hilangnya integritas endotelium, proliferasi dan migrasi sel otot polos, serta perlekatan dan migrasi leukosit (Daiber et al., 2017).



Gambar 2. 5. Patofisiologi disfungsi endothelium. Perkembangan dari faktor risiko menjadi aterosklerosis dan penyakit kardiovaskular yang dimediasi oleh stress oksidatif dan disfungsi endotel. Deteksi dini disfungsi endotel merupakan titik kritis dalam pencegahan aterosklerosis dan penyakit kardiovaskular karena disfungsi ini dapat menjadi langkah awal yang reversibel dalam proses aterosklerosis (Park & Park, 2015).

Respon ketergantungan endotel terhadap vasodilat pada prinsipnya diatur sebagai respon terhadap tegangan geser dengan pelepasan nitrit oksida (NO) yang disintesis dari asam amino L-arginin oleh sintase nitrit oksida endotelial (eNOS) yang mengarah pada produksi GMP siklik intraseluler. Dalam keadaan seperti ini ketika vasodilatasi yang dimediasi NO terganggu, respon vasodilatasi diperkirakan difasilitasi oleh faktor turunan sitokrom, peptida nautreik, dan prostasiklin (Widmer & Lerman, 2014). Reaksi ini membutuhkan sejumlah kofaktor, termasuk tetrahydrobiopterin (BH₄) dan *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH). Peningkatan Ca⁺⁺ intraselular dalam merespon vasodilator agonist seperti asetilkolin, serotonin, bradykinin atau respon terhadap *shear stress* merubah *inhibitor caveolin* dari calmodulin (CaM), menjadi eNOS teraktivasi. NO kemudian berdifusi pada otot polos pembuluh darah dan menyebabkan aktivasi dari protein kinase yang menyebabkan fosforilasi dari K⁺ *dependent channel* menyebabkan relaksasi otot polos (Kurniawan & Yanni, 2020).

Peningkatan kadar penanda inflamasi juga berhubungan dengan disfungsi endotel. Peningkatan beberapa penanda ini, seperti IL-6, yang merangsang peningkatan CRP, terkait dengan penurunan konsentrasi NO yang disebabkan oleh penurunan aktivitas eNOS. Pengurangan ini dapat menyebabkan penurunan vasodilatasi yang bergantung pada endotel, yang dapat meningkatkan risiko disfungsi endotel dan penyakit kardiovaskular (Teixeira et al., 2014).

Meskipun mekanisme patofisiologis yang mendasari disfungsi endotel cenderung multifaktorial, peningkatan produksi spesies oksigen reaktif (ROS) di dalam dinding pembuluh darah oleh sistem seperti nikotinamida adenin dinukleotida oksidase fosfat, xantin oksidase, rantai transpor elektron mitokondria, dan rantai transpor elektron mitokondria. *Endothelial nitric oxide synthase* (eNOS) diperkirakan berkontribusi pada fenomena ini. Reaksi yang sangat cepat dan terbatas difusi dari NO dengan superoksida mengarah pada pembentukan oksidan peroksinitrit (ONOO^-) yang sangat reaktif, yang memiliki efek vasokonstriksi dan sitotoksik, menyebabkan kerusakan oksidatif pada protein, lipid, dan DNA. Degradasi oksidatif NO oleh superoksida, pelepasan eNOS dan nitrasi tirosin atau inaktivasi prostasiklin sintase adalah tiga contoh khusus bagaimana stres oksidatif merusak fungsi endotel (Münzel et al., 2020).

Tabel 2. 4. Ringkasan Perbedaan antara endothelium normal dan yang mengalami disfungsi.

Endotel Normal	Disfungsi Endotel
Vasodilatasi (NO, PGI ₂ ↑)	Vasodilatasi terganggu (NO, PGI ₂ ↓)
Stres oksidatif ↓	Stres oksidatif ↑
Anti-koagulan (PAI-1, vWF, selektin-P↓)	Pro-koagulan (PAI-1, vWF, selektin-P↑)
Anti-inflamasi (ICAM, VCAM, selektin-E, CRP, TNF-α, IL-6, MCP-1↓)	Pro-inflamasi (ICAM, VCAM, selektin-E, CRP, TNF-α, IL-6, MCP-1↑)
Regenerasi EPC↑, MP↓)	Degenerasi (EPC↓, MP↑)

Sumber: Kurniawan & Yanni (2020)

2. Pengukuran NO

Nitrit oksida (NO) adalah molekul gas berumur pendek yang berfungsi sebagai pembawa pesan biologis intra dan antar sel (Khan et al., 2020). Nitric oxide (NO) disintesis oleh tiga isoform nitric-oxide synthase (NOS) sebagai berikut: NOS neuronal (nNOS, NOS1), NOS yang dapat diinduksi (iNOS, NOS2), dan NOS endotel (eNOS, NOS3). nNOS dan eNOS diekspresikan secara konstitutif dan memerlukan peningkatan intraseluler ($[\text{Ca}^{2+}]$) untuk aktivasi, sedangkan ekspresi

iNOS diaktifkan hanya oleh sitokin seperti lipopolisakarida, interleukin 1, dan tumor necrosis factor alpha (TNF α), diinduksi sebagai respons terhadap rangsangan inflamasi dan, setelah disintesis, terikat erat dengan Ca²⁺-calmodulin dan dengan demikian aktif secara konstitutif. Sumber utama NO dalam pembuluh darah adalah eNOS dalam kondisi normal, sedangkan iNOS menjadi menonjol dalam kondisi inflamasi (Budani & Tiboni, 2021; Lowry et al., 2013).

Nitric oxide (NO) adalah radikal bebas yang tidak stabil secara biologis, lipofilik, sangat mudah menyebar, yang mengatur berbagai fungsi biologis. Sejak penemuan NO dalam sistem kardiovaskular sebagai faktor relaksasi yang diturunkan dari endotel (*Endothel-derived Releasing Factor*), para peneliti telah mengidentifikasi peran NO dalam berbagai proses patofisiologi (Khan et al., 2020).

Nitric oxide synthase (NOS) dan *nitric oxide* (NO) adalah molekul sinyal penting yang mengatur sistem saraf dan pembuluh darah, dan memiliki berbagai efek fisiologis dan patologis. Secara fisiologis, NO bertindak sebagai vasodilator endogen dan pembawa pesan antar sel yang penting dalam aliran darah otak dan perifer. Sedangkan secara patologis, NO dapat bereaksi dengan anion superoksida (O₂⁻) membentuk oksidan kuat peroksinitrit (ONOO⁻). ONOO⁻ dapat memicu stres oksidatif dan kemudian menyebabkan kerusakan sel, seperti degenerasi dan inaktivasi protein, peroksidasi lipid, dan kerusakan DNA yang semakin memperburuk kerusakan patologis tubuh. Stres oksidatif terjadi akibat perubahan jalur NOS/NO yang pada akhirnya akan memperburuk stress oksidatif itu sendiri dan menyebabkan serangkaian perubahan patologis (Zhu et al., 2021).

Biomarker dari disfungsi endotel mencerminkan perubahan pada bioavailabilitas NO, peningkatan stres oksidatif, koagulasi dan inflamasi endotel dimana NO yang diproduksi oleh sel-sel endotel merupakan penentu utama vasodilatasi endotel dependen dan merupakan inhibitor koagulasi, inflamasi dan stress oksidatif yang telah dianggap sebagai penanda status endotel yang penting (Kurniawan & Yanni, 2020).

Nitrit oksida dapat menyebabkan guanilil siklase dalam otot polos vaskuler tidak aktif, sehingga terjadi akumulasi guanosin monofosfat sitosol (cGMP) dan relaksasi. Nitrit oksida diproduksi oleh sel endotel dari asam amino L-arginin dalam suatu reaksi yang dikatalisis oleh enzim nitrit oksida sintase (NOS). Sintesis NO dari endotel vaskuler terjadi secara terus menerus untuk mempertahankan tonus vaskuler rendah yang bersifat protektif terhadap kejadian penyakit kardiovaskuler. NO memberikan fungsi regulasi yang relevan dalam berbagai proses fisiologis,

termasuk vasodilatasi, pensinyalan saraf, respons imun, mencegah adhesi leukosit dan trombosit ke dinding vaskular atau bertindak sebagai mediator di beberapa neuron pusat dan ujung saraf perifer. Lebih penting lagi, ia berperan dalam makrofag selama respons inflamasi (Budani & Tiboni, 2021; Suryana & Restuti, 2017).

Selama beberapa tahun terakhir, berbagai metode deteksi termasuk kolorimetri, chemiluminescence, fluoresensi, penginderaan elektrokimia, kromatografi gas, spektroskopi resonansi spin elektron (ESR) dan pencitraan resonansi magnetik (MRI) telah dikembangkan untuk membantu memahami patologi dan untuk mengobati berbagai penyakit (Goshi et al., 2019). ELISA adalah uji biokimia analitik sensitif dan spesifik yang digunakan untuk deteksi dan analisis kuantitatif atau kualitatif analit tanpa memerlukan peralatan canggih atau mahal. Analit dapat berupa zat spesifik apa pun, baik protein spesifik atau campuran yang lebih kompleks dari lebih dari satu protein (misalnya kompleks biomolekuler) (Konstantinou, 2017). Strategi yang menggunakan masing-masing metode ini dengan kata kunci yang tepat dan daftar berbagai cara yang digunakan oleh para peneliti untuk mendeteksi dan mengukur NO secara *in vitro* dan *in vivo* (Goshi et al., 2019).

E. HUBUNGAN ASAP ROKOK DENGAN DISFUNGSI ENDOTEL

Penyakit kardiovaskular merupakan penyebab utama kematian pada perokok dan 30% kematian koroner per tahun di Amerika Serikat disebabkan oleh merokok dan penggunaan produk tembakau memengaruhi berbagai bentuk penyakit kardiovaskular serta faktor risiko utamanya (Favero et al., 2014).

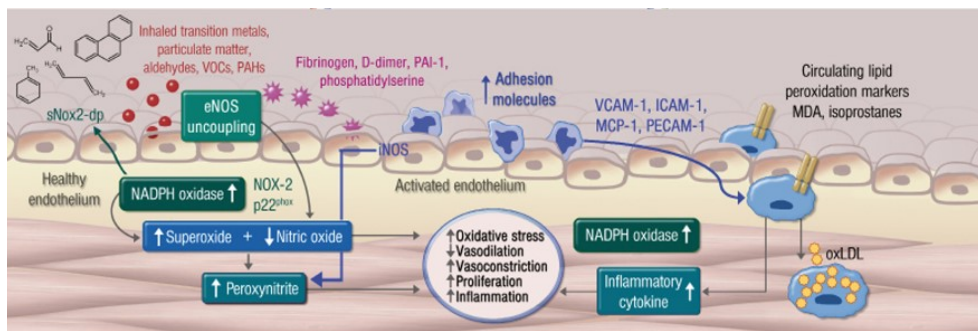
Merokok menyumbang 175.000 kematian kardiovaskular setiap tahun di Amerika Serikat dan menurut Monografi WHO/Institut Kanker Nasional 2016, pada sebuah laporan global tentang pengendalian tembakau, jumlah kematian global terkait tembakau dapat diproyeksikan meningkat dari sekitar 6 juta menjadi 8 juta per tahun pada tahun 2030, dengan lebih dari 1 miliar orang merokok dimana sekitar 30% adalah pria dan 7% adalah wanita, serta lebih dari 80% tinggal di negara berpenghasilan rendah dan menengah (Benowitz & Burbank, 2016; J. Li et al., 2018; Nolan et al., 2018; West, 2017).

Merokok secara nyata meningkatkan risiko terjadinya coroner dan serebrovaskular akut, termasuk infark miokard, stroke, dan kematian mendadak. Merokok mempercepat aterosclerosis yang menghasilkan aterosklerosis prematur

di arteri koroner epikardial, arteri aorta, karotis, dan serebral, serta sirkulasi perifer (Meza et al., 2019).

Pada tahun 2012, *Food and Drug Administration* (FDA) Amerika Serikat, menerbitkan daftar "Konstituen Berbahaya dan Berpotensi Berbahaya (HPHCs) dalam Produk Tembakau dan Asap Tembakau" dan pada daftar ini terdiri dari 93 senyawa kimia yang dipilih berdasarkan efek klinis yang merugikan (senyawa yang diketahui menyebabkan kanker, penyakit kardiovaskular, efek pernapasan, efek perkembangan atau reproduksi, dan kecanduan). Kelompok utama senyawa yang disebutkan dalam daftar adalah karbonil, senyawa organik yang mudah menguap, N'-nitrosamin, senyawa heterosiklik dan senyawa anorganik (logam) (Münzel et al., 2020).

Asap rokok mengandung banyak radikal bebas dan mengantarkan radikal bebas langsung ke dinding pembuluh darah. Selain menjadi pemasok radikal bebas, asap rokok memfasilitasi pelepasan ROS secara endogen melalui aktivasi sel-sel inflamasi. Oleh karena itu, merokok dikaitkan dengan stres oksidatif, peradangan, dan pelepasan faktor sirkulasi yang terkait dengan cedera endotel dan disfungsi endotel. Selain itu, merokok telah dilaporkan dapat menurunkan kadar kolesterol HDL, yang diketahui memiliki sifat anti-aterosklerotik dan meningkatkan fungsi endotel (Park & Park, 2015).



Gambar 2. 6. Efek radikal bebas pada disfungsi endothelium (vascular) (Münzel et al., 2020).

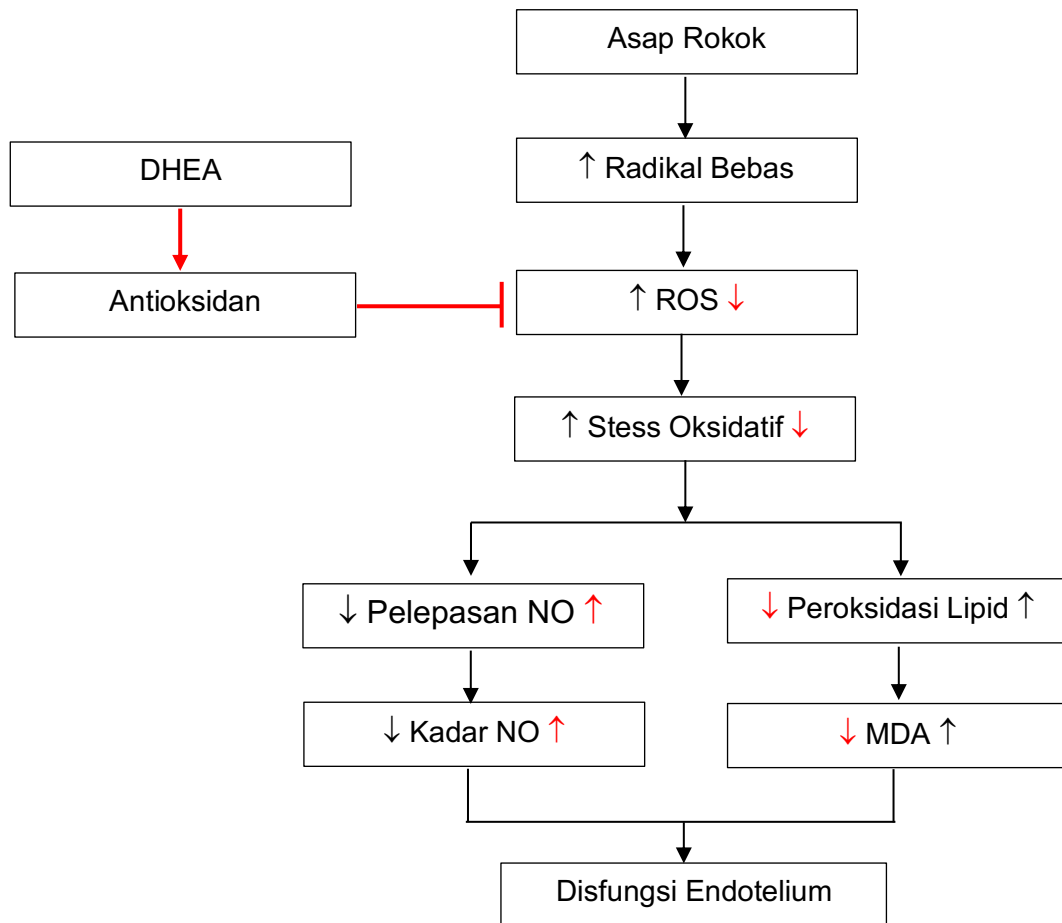
Paparan asap rokok menghasilkan penghambatan tergantung dosis dari kompleks mitokondria I dan kompleks II, yang melemahkan respirasi mitokondria dan mengurangi produksi ATP. Asap rokok meningkatkan akumulasi seramida kardiomyosit, yang meningkatkan produksi mitokondria superoksida ($O_2^{\cdot-}$) dan H_2O_2 , dan mengubah vasodilatasi yang diinduksi aliran. Selanjutnya, paparan asap rokok menyebabkan perubahan metabolisme dan menyebabkan

pemrograman ulang metabolik epitel. Namun, efek buruk dari asap rokok tidak terbatas pada epitel saluran napas dan menyebar dengan sirkulasi ke berbagai organ, menyebabkan peningkatan aktivitas simpatik sistem saraf pusat, disfungsi endotel, dan peradangan. Efek berbahaya ini dimediasi oleh beberapa konstituen asap rokok, seperti nikotin dan senyawa stabil lainnya yang terakumulasi dalam kondensat asap rokok (Dikalov et al., 2019).

Berbagai mekanisme telah disarankan sebagai hubungan yang mendasari antara nikotin dan penyakit kardiovaskular, termasuk peradangan, disfungsi/cedera endotel, aktivasi trombosis, dan modifikasi profil lipid. Nikotin dapat menyebabkan disfungsi endotel. Pemberian nikotin akut dan kronis mengganggu relaksasi yang bergantung pada endotel dan menyebabkan kelainan morfologi endotel (Daiber et al., 2017).

Disfungsi endotel merupakan langkah kunci dalam inisiasi dan pemeliharaan aterosklerosis dan dapat menjadi penanda untuk risiko penyakit kardiovaskular lebih lanjut. Kurangnya ketersediaan hayati NO yang disebabkan oleh stres oksidatif adalah ciri umum disfungsi endotel. Di sini dijelaskan bahwa disfungsi endotel akibat peningkatan nikotin disertai dengan peningkatan stres oksidatif lebih lanjut dan penurunan ekspresi eNOS dalam pembuluh darah tikus obesitas yang diinduksi makanan menjelaskan bahwa nikotin dapat meningkatkan disfungsi endotel melalui induksi lebih lanjut dari ketidakseimbangan antara NO vaskular dan ROS (Meza et al., 2019).

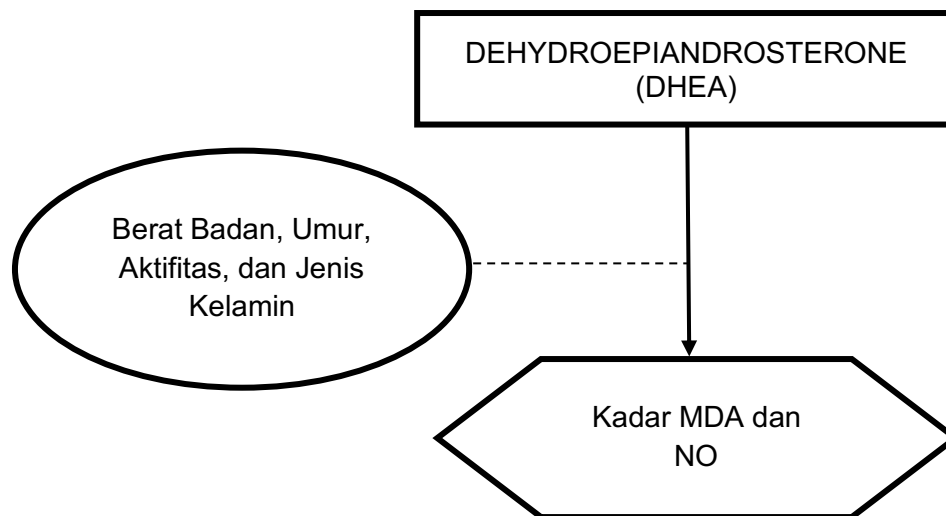
F. KERANGKA TEORI



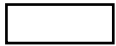
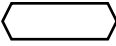

Keterangan:

- : Pengaruh Pemberian DHEA
- : Pengaruh Paparan Asap Rokok

Gambar 2. 7. Kerangka Teori

G. KERANGKA KONSEP

Keterangan:

-  : Variabel Independen
-  : Variabel Dependen
-  : Variabel Kontrol

Gambar 2. 8. Kerangka Konsep

H. HIPOTESIS

1. Hipotesis Nol (H_0)
 - a. Tidak terdapat pengaruh pemberian *dehydroepiandrosterone* (DHEA) terhadap kadar MDA pada aorta tikus wistar jantan yang terpapar asap rokok.
 - b. Tidak terdapat pengaruh pemberian *dehydroepiandrosterone* (DHEA) terhadap kadar nitrit oksida pada aorta tikus wistar jantan yang terpapar asap rokok.
2. Hipotesis Alternatif (H_a)
 - a. Terdapat pengaruh pemberian *dehydroepiandrosterone* (DHEA) terhadap kadar MDA pada aorta tikus wistar jantan yang terpapar asap rokok.
 - b. Terdapat pengaruh pemberian *dehydroepiandrosterone* (DHEA) kadar nitrit oksida pada aorta tikus wistar jantan yang terpapar asap rokok.