



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH *DARK CHOCOLATE* TERHADAP KADAR NO_x SERUM DAN
TEKANAN DARAH PENDERITA PRAHIPERTENSI**

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar magister

VERAWATI

0806419926

**KEKHUSUSAN ILMU GIZI KLINIK
PROGRAM STUDI ILMU GIZI
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS INDONESIA
JAKARTA, JUNI 2010**

LEMBAR PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :

Nama : Verawati
NPM : 0806419926
Program Studi : Ilmu Gizi, Kekhususan Ilmu Gizi Klinik
Judul Tesis : Pengaruh *Dark Chocolate* Terhadap Kadar NOx Serum dan Tekanan Darah Penderita Prahipertensi

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


DEWAN PENGUJI

Pembimbing I	: dr. Sri Sukmaniah, MSc, SpGK	(.....)
Pembimbing II	: Dr. dr. Parlindungan Siregar, SpPD-KGH	(.....)
Penguji	: dr. Lanny Lestiani, MSc, SpGK	(.....)
Penguji	: dr. Ninik Mudjihartini, MS	(.....)
Penguji	: dr. Aida Lydia, SpPD-KGH	(.....)

Ditetapkan di : Jakarta
Tanggal : 15 Juni 2010

LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Verawati
NPM : 0806419926
Tanda tangan : 
Tanggal : 15 Juni 2010

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

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

Nama : Verawati

NPM : 0806419926

Program Studi : Ilmu Gizi, Kekhususan Ilmu Gizi Klinik

Fakultas : Kedokteran

Jenis Karya : Tesis

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

**PENGARUH *DARK CHOCOLATE* TERHADAP KADAR NO_x SERUM DAN
TEKANAN DARAH PENDERITA PRAHIPERTENSI**

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini, Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalih media/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di Jakarta

Pada tanggal 15 Juni 2010

Yang menyatakan,



(Verawati)

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur ke hadapan Bapa di sorga, Tuhan kami Yesus Kristus atas berkat, kasih dan penyertaan-Nya sehingga peneliti dapat menyelesaikan penyusunan tesis ini.

Penelitian ini merupakan uji klinis mengenai efek pemberian *dark chocolate* terhadap kadar NOx serum dan tekanan darah penderita prahipertensi, yang dilakukan pada karyawan administrasi laki-laki dan perempuan di FKG Universitas Prof. Dr. Moestopo (Beragama) dan PT. Andalan Darma Mulia.

Selesaiannya tesis ini tidak lepas dari tuntunan dan bimbingan dari dosen pembimbing dan staf pengajar Departemen Ilmu Gizi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Untuk itu penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada dr. Sri Sukmaniah, MSc, SpGK sebagai pembimbing I yang dengan kesabaran, ketekunan, dan ketelitian yang terus diberikan sejak seminar tinjauan pustaka hingga selesainya penyusunan tesis ini.

Kepada DR. dr. Parlindungan Siregar, SpPD-KGH sebagai pembimbing II, penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan setinggi-tingginya karena di sela-sela jadwal beliau yang padat, beliau masih meluangkan waktu untuk membimbing dan mengarahkan penulis dalam menyelesaikan tesis ini.

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

Ucapan terima kasih kepada seluruh karyawan Departemen Ilmu Gizi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dan seluruh peserta program magister Kekhususan Ilmu Gizi Klinik, khususnya angkatan 2008 atas bantuan dan dukungannya.

Terima kasih yang tidak terhingga kepada seluruh subyek penelitian yang telah mengikuti seluruh rangkaian penelitian. Terima kasih kepada Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Prof. Dr. Moestopo (Beragama) dan Direktur PT.

Andalan Darma Mulia yang telah mengizinkan penulis melakukan penelitian di lingkungan kerjanya. Terima kasih yang tak terhingga kepada seluruh subyek penelitian yang telah mengikuti rangkaian penelitian hingga selesai. Terima kasih juga kepada seluruh sahabat dan semua pihak yang telah membantu yang tidak dapat disebutkan satu per satu untuk dukungan dan motivasi selama penulis menjalankan pendidikan.

Penulis menghaturkan terima kasih yang setinggi-tingginya kepada orang tua, kakak dan adik yang senantiasa berdoa untuk keberhasilan penulis dalam penelitian ini dan dengan tulus ikhlas memberikan dorongan dan dukungan sepenuhnya.

Terima kasih yang setinggi-tingginya kepada suami tercinta, drg. Kristanto Sempuno atas segala doa, kasih, dukungan dan pengertian sepanjang pendidikan hingga penyelesaian tesis ini. Kepada anakku tersayang, Aileen Livia Sempuno, yang menjadi sumber kebahagiaan dan inspirasi penulis dalam menjalani dan menyelesaikan pendidikan.

Akhir kata, penulis berharap Tuhan Yang Maha Esa berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga tesis ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Jakarta, 15 Juni 2010

Penulis

ABSTRAK

Nama : Verawati

Program Studi : Ilmu Gizi, Kekhususan Ilmu Gizi Klinik

Judul : Pengaruh *Dark Chocolate* Terhadap Kadar NO_x Serum Dan Tekanan Darah Penderita Prahipertensi

Objektif. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian *dark chocolate* 30 g/hari selama 15 hari berturut-turut terhadap kadar NO_x serum dan tekanan darah karyawan administrasi laki-laki dan perempuan penderita prahipertensi.

Metode. Penelitian ini adalah suatu uji klinis paralel. Sebanyak 32 subyek penelitian yang memenuhi kriteria dibagi dalam dua kelompok secara randomisasi blok. Sebanyak 16 orang mendapat *dark chocolate* 30 g/hari disertai dengan penyuluhan gizi dan 16 orang mendapat *white chocolate* 25 g/hari disertai dengan penyuluhan gizi. Data yang diambil meliputi usia, aktivitas fisik, indeks massa tubuh, asupan energi, natrium, dan polifenol, kadar NO_x serum dan tekanan darah. Pemeriksaan kadar NO_x serum dilakukan pra perlakuan (H0) dan pasca perlakuan (H+16), sedangkan pengukuran tekanan darah dilakukan pra perlakuan (H0), selama perlakuan (H+8) dan pasca perlakuan (H+16).

Hasil. Asupan polifenol selama perlakuan lebih tinggi pada kelompok perlakuan dibanding kelompok kontrol. Pasca perlakuan, didapatkan perbedaan yang bermakna pada kadar NO_x serum antara kelompok P dengan kelompok K ($p=0,001$). Tekanan darah pada kedua kelompok mengalami penurunan. Tekanan darah sistolik pasca perlakuan berbeda bermakna antara kelompok P dan kelompok K ($p=0,001$), sedangkan tekanan darah diastolik menurun tidak bermakna ($p=0,308$). Tekanan darah sistolik dan diastolik pra dan pasca perlakuan kelompok P menurun bermakna ($p=0,000$), sedangkan tekanan darah sistolik dan diastolik pra dan pasca perlakuan pada kelompok K menurun tidak bermakna.

Kesimpulan. Setelah 15 hari perlakuan, terjadi peningkatan asupan polifenol di kelompok perlakuan yang disertai peningkatan kadar NO_x serum dan penurunan bermakna tekanan darah sistolik, sedangkan tekanan darah diastolik menurun tidak bermakna.

Kata kunci. *Dark chocolate*, polifenol, kadar NO_x serum, prahipertensi

ABSTRACT

Name : Verawati

Study Program : Nutrition, Clinical Nutrition

Judul : Effect of *Dark Chocolate* on NO_x Serum Level and Blood Pressure
in Prehypertension Subjects

Objective. This study was conducted to investigate the effect of dark chocolate 30 g/day for fifteen day on NO_x serum level and blood pressure in male and female administration employee with prehypertension.

Methods. The study was a parallel clinical trial. A total of thirty two subjects who were selected using certain criteria divided into two groups using block randomization. Sixteen subjects received 30 g/day dark chocolate and dietary counseling (Treatment Group) and other 16 subjects received white chocolate 25 g/day and dietary counseling (Control Group) for fifteen days. Data collected in this study consist of age, physical activity, body massa index, intake of energy, sodium, and polyphenol, NO_x serum levels and blood pressure. Assessment on NO_x serum level were done in pre treatment and after treatment, while blood pressure were assessed in pre treatment, in treatment period and after treatment.

Results. Polyphenol intake in treatment periode in treatment group was significantly higher compared with control groups. After 15 days treatment, NO_x serum level between treatment and control groups was significantly different ($p=0,001$). Both group had decreased systolic and diastolic blood pressure. Systolic blood pressure was decreased significantly between groups after treatment ($p=0,001$), while diastolic blood pressure was not significant ($p=0,308$). Systolic and diastolic blood pressure pre and after treatment in treatment group were significantly decreased, while it was not significant in control group.

Conclusions. There was increased polyphenol intake in treatment group which increased serum NO_x level, significantly decreased systolic blood pressure while no significant decrease in diastolic blood pressure after 15 days treatment.

Keywords. Dark chocolate, polyphenol, NO_x serum level, prehypertension

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN.....	ii
LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iii
LEMBAR PERNYATAAN PUBLIKASI.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
DAFTAR SINGKATAN.....	xiv
1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Permasalahan	3
1.2.1. Identifikasi masalah.....	3
1.2.2. Perumusan masalah	3
1.3. Hipotesis.....	3
1.4. Tujuan	3
1.4.1. Tujuan umum.....	3
1.4.2. Tujuan khusus.....	4
1.5. Manfaat	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. PRAHIPERTENSI.....	5
2.1.1 Definisi prahipertensi.....	5
2.1.2 Faktor risiko prahipertensi.....	5
2.1.3 Patofisiologi prahipertensi.....	6
2.1.4 Risiko penyakit kardiovaskular pada prahipertensi.....	7
2.1.5 Terapi nonfarmakologis prahipertensi.....	8
2.2. <i>NITRIC OXIDE</i> (NO).....	8
2.2.1 Biosintesis <i>Nitric Oxide</i> (NO).....	9
2.2.2 <i>Nitric Oxide</i> (NO) sebagai vasodilator.....	10
2.2.3 Disfungsi endotel.....	11
2.3. <i>DARK CHOCOLATE</i>	12
2.3.1 Proses pembuatan cocoa dan coklat.....	12
2.3.2 Kandungan nutrisi.....	13
2.3.3 Zat aktif.....	14
2.3.4 Sifat fisika & kimia.....	16
2.3.5 Absorpsi, transpor, metabolisme & ekskresi	17
2.3.6 Bioavailabilitas.....	18
2.3.7 Fungsi.....	19
2.3.8 Dosis & toksisitas.....	21

2.4	PENGARUH <i>DARK CHOCOLATE</i> TERHADAP TEKANAN DARAH DAN <i>NITRIC OXIDE</i>	22
2.5	Kerangka Teori.....	26
2.6	Kerangka Konsep.....	27
3.	METODA PENELITIAN	28
3.1	Rancangan Penelitian.....	28
3.2.	Tempat dan Waktu Penelitian.....	28
3.3.	Bahan Penelitian	28
3.4.	Instrumen Pengumpulan Data.....	31
3.5.	Cara Kerja	32
3.6.	Identifikasi Variabel.....	36
3.7.	Pengolahan, Analisis, Interpretasi, dan Penyajian Data.....	36
3.8.	Batasan Operasional.....	37
3.9.	Kerangka Operasional.....	41
4.	HASIL PENELITIAN.....	42
4.1	Seleksi Subyek Penelitian.....	42
4.2	Karakteristik Subyek Penelitian.....	43
4.3	Asupan Energi, Natrium, dan Polifenol Pra Perlakuan dan Selama Perlakuan Berdasarkan <i>Food Record 2x24 Jam</i>	45
4.4	Kadar NOx Serum Pra dan Pasca Perlakuan.....	46
4.5	Tekanan Darah Sistolik Pra Perlakuan, Selama Perlakuan dan Pasca Perlakuan.....	46
4.6	Korelasi Kadar NOx Serum dengan Tekanan Darah Sistolik dan Diastolik.....	47
5.	PEMBAHASAN.....	48
5.1	Keterbatasan Penelitian.....	48
5.2	Seleksi Subyek Penelitian.....	49
5.3	Karakteristik Subyek Penelitian.....	50
5.4	Asupan Energi, Natrium dan Polifenol Pra Perlakuan dan Selama Perlakuan Berdasarkan <i>Food Record 2x24 Jam</i>	52
5.5	Kadar NOx Serum Pra dan Pasca Perlakuan.....	54
5.6	Tekanan Darah Sistolik dan Diastolik.....	54
5.7	Korelasi Kadar NOx Serum dan Tekanan Darah.....	56
6.	RINGKASAN, KESIMPULAN DAN SARAN.....	57
6.1	Ringkasan.....	57
6.2	Kesimpulan.....	59
6.3	Saran.....	59
	SUMMARY, CONCLUSIONS, AND RECOMMENDATIONS.....	61
	DAFTAR REFERENSI.....	64
	MANUSCRIPT.....	70
	LAMPIRAN-LAMPIRAN.....	79
	DAFTAR RIWAYAT HIDUP.....	105

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Klasifikasi tekanan darah.....	5
Tabel 2.2 Terapi nonfarmakologi prahipertensi.....	8
Tabel 2.3. Kandungan nutrisi dalam coklat.....	13
Tabel 2.4. Polifenol dalam makanan.....	14
Tabel 2.5. Komposisi flavanoid dalam cocoa dan <i>dark chocolate</i> (mg/g)	15
Tabel 2.6. 24 jam <i>Ambulatory Blood Pressure Monitoring</i> (ABPM) sebelum dan sesudah perlakuan selama 15 hari dengan <i>dark chocolate</i> atau <i>white chocolate</i> terhadap 20 penderita hipertensi essensial.....	23
Tabel 2.7. Ringkasan penelitian.....	25
Tabel 3.1. Klasifikasi status gizi dewasa Asia Pasifik.....	38
Tabel 3.2. Interpretasi asupan energi.....	39
Tabel 3.3 Interpretasi asupan natrium.....	39
Tabel 3.4 Interpretasi indeks aktivitas fisik.....	40
Tabel 3.5 Interpretasi kadar NOx serum.....	40
Tabel 4.1 Sebaran subyek penelitian berdasarkan usia, jenis kelamin, aktivitas Fisik, indeks massa tubuh, kadar NOx serum dan tekanan darah Pra perlakuan.....	44
Tabel 4.2 Rerata dan simpang baku asupan energi, natrium dan polifenol Pra perlakuan, H+8, Pasca perlakuan berdasarkan <i>Food Record</i> 2x24 jam.....	45
Tabel 4.3 Asupan energi terhadap persentase kebutuhan energi total individu.....	45
Tabel 4.4 Kadar NOx serum pra dan pasca perlakuan.....	46
Tabel 4.5 Rerata dan simpang baku tekanan darah pada pra perlakuan, H+8 Dan pasca perlakuan.....	46
Tabel 4.6 Korelasi antara perubahan kadar NOx serum dan tekanan darah Sistolik dan diastolik.....	47

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Patofisiologi prahipertensi.....	7
Gambar 2.2	Mekanisme biosintesis dan efek vasodilatasi NO.....	9
Gambar 2.3.	Pembentukan NO dalam darah dan jaringan.....	10
Gambar 2.4.	Pengaturan bioavailabilitas NO.....	11
Gambar 2.5.	Bioavailabilitas NO dan disfungsi endotel.....	12
Gambar 2.6.	Buah dan biji cocoa.....	12
Gambar 2.7.	Klasifikasi polifenol.....	14
Gambar 2.8.	Kandungan flavanol dan <i>procyanidin</i> dalam <i>dark chocolate</i> Dibandingkan bahan makanan sumber lain.....	15
Gambar 2.9.	Struktur dasar flavanols.....	16
Gambar 2.10.	Struktur kimia <i>catechin</i> dan <i>epicatechin</i>	17
Gambar 2.11.	Kandungan antioksidan dalam bahan makanan berdasarkan <i>oxygen radical absorbance capacity (ORAC)</i>	20
Gambar 2.12.	Pengaruh <i>cocoa</i> polifenol terhadap NO endotel.....	21
Gambar 2.13.	Efek konsumsi <i>dark chocolate</i> dan <i>white chocolate</i> terhadap tekanan darah sistolik dan diastolik kepada 15 orang subyek sehat.....	22



DAFTAR SINGKATAN

ADM	: Andalan Darma Mulia
AI	: <i>Adequate Intake</i>
AKG	: Angka Kecukupan Gizi
AF	: Aktivitas Fisik
BB	: Berat Badan
BH4	: <i>Tetrahydrobiopterin</i>
BMI	: <i>Body Mass Index</i>
CHD	: <i>Coronary Heart Disease</i>
CRP	: <i>C-Reactive Protein</i>
CVD	: <i>Cardio Vascular Disease</i>
DASH	: <i>Dietary Approaches to Stop Hypertension</i>
DRI	: <i>Dietary Reference Intakes</i>
eNOS	: <i>endothelial Nitric Oxide Synthase</i>
ETM	: Efek Termik Makanan
FKG-UPDM (B)	: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Prof. Dr. Moestopo (Beragama)
GTP	: <i>Guanosine Triphosphate</i>
IAF	: Indeks Aktivitas Fisik
IMT	: Indeks Massa Tubuh
JNC 7	: <i>The Seventh Report of the Joint National Committee</i>
KEB	: Kebutuhan Energi Basal
KET	: Kebutuhan Energi Total
NADPH	: <i>Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NHANES	: <i>National Health And Nutrition Examination Survey</i>
NO	: <i>Nitric Oxide</i>
NOx	: Kadar Nitrat dan Nitrit
NOS	: <i>Nitric Oxide Synthase</i>
ORAC	: <i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>
PKV	: Penyakit Kardiovaskular
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SKRT	: Survei Kesehatan Rumah Tangga
TB	: Tinggi Badan
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor α</i>
U	: Usia
URT	: Ukuran Rumah Tangga
XO	: <i>Xanthine Oxidase</i>
TAC	: <i>Total Antioxidant Capacity</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Lembar Persetujuan Komite Etik.....	79
Lampiran 2	Lembar Informasi Penelitian	80
Lampiran 3	Lembar Persetujuan	81
Lampiran 4	Data Karakteristik Subyek.....	82
Lampiran 5	Lembar Seleksi dan Riwayat Penyakit.....	83
Lampiran 6	Lembar Catatan Asupan Makanan	84
Lampiran 7	Lembar Keluhan Subyek	86
Lampiran 8	Lembar Hasil Pemeriksaan Klinis.....	87
Lampiran 9	Lembar Indeks Aktivitas Fisik (IAF).....	88
Lampiran 10	Prosedur Pemeriksaan Laboratorium	92
Lampiran 11	Prosedur Randomisasi Blok.....	100
Lampiran 12	Contoh Menu Diet Seimbang Sehari.....	101
Lampiran 13	Kandungan Nutrisi <i>Dark Chocolate</i> dan <i>White Chocolate</i>	102
Lampiran 14	Kandungan Polifenol dan Flavanol <i>Dark Chocolate</i>	103
Lampiran 15	Kandungan Polifenol <i>White Chocolate</i>	104



BAB 1

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Prahipertensi adalah keadaan yang ditandai tekanan darah sistolik antara 120-139 mm Hg dan atau tekanan darah diastolik antara 80-89 mm Hg.¹ Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) Indonesia tahun 2004 menunjukkan rerata tekanan darah kelompok usia 25-34 tahun adalah 124,7/79,9 mm Hg kemudian meningkat dengan bertambahnya usia.²

Pada usia lebih dari 45 tahun, tekanan darah hipertensi lebih banyak ditemukan dibanding prahipertensi, hal tersebut disebabkan karena telah terjadi perubahan menetap di pembuluh darah.³ Rentang usia 25-44 tahun adalah golongan usia produktif yang pada golongan ekonomi menengah umumnya bekerja sebagai karyawan.² Umumnya seorang karyawan dalam kesehariannya ditandai dengan pola makan tidak sehat dan kurang aktifitas fisik yang merupakan pemacu terjadinya prahipertensi.^{2,4}

Penderita prahipertensi berisiko dua kali lipat menderita penyakit jantung koroner atau stroke dibanding dengan kelompok normotensif. Selain itu terjadi peningkatan 27% mortalitas secara umum dan 66% mortalitas yang disebabkan oleh penyakit kardiovaskular (PKV) pada prahipertensi.⁵ Faktor risiko terjadinya peningkatan tekanan darah antara lain obesitas, usia, tingginya asupan kalori atau natrium, kurang aktifitas, merokok dan asupan alkohol berlebihan.⁴

Gangguan vaskular pada penderita prahipertensi disebabkan penurunan pembentukan dan bioavailabilitas *nitric oxide* (NO) yang menyebabkan terjadinya disfungsi endotel.⁶ *Nitric Oxide* adalah vasodilator yang dihasilkan oleh endotelium yang berfungsi menjaga tonus vaskular. Sintesis dan bioavailabilitas NO dipengaruhi oleh arginin, *Nitric Oxide Synthase* (NOS) dan anion superoksida.⁷ *Nitric oxide* memiliki waktu paruh yang sangat pendek, sehingga dalam analisis kimia klinik pemeriksaan nitrit dan nitrat serum yang merupakan metabolit NO (NOx) umumnya digunakan sebagai marker aktifitas NOS dan produksi NO.⁸

Polifenol merupakan zat yang banyak terkandung dalam diet manusia, baik dalam bentuk makanan atau minuman yang berasal dari tumbuhan.⁹ Salah satu jenis

polifenol adalah flavanol, yang berdasarkan studi epidemiologi dan klinik menunjukkan efek perlindungan terhadap sistem kardiovaskular.¹⁰ Fungsi tersebut berdasarkan kemampuan polifenol flavanol dalam meningkatkan kapasitas antioksidan plasma, menurunkan produk oksidasi plasma dan mengaktivasi *endothelial Nitric Oxide Synthase* (eNOS) yang akan meningkatkan sintesis dan bioavailabilitas NO sehingga akan memperbaiki fungsi endotel.¹¹

Dark chocolate, salah satu jenis cokelat yang mulai banyak ditemukan di masyarakat, merupakan sumber flavanol dan memiliki kadar antioksidan tertinggi dibandingkan bahan makanan sumber lain berdasarkan pemeriksaan *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC).¹² Sebaliknya, *white chocolate* adalah cokelat yang tidak diproses dari bubuk *cocoa* sehingga tidak mengandung flavanol.¹² Beberapa penelitian menunjukkan bahwa pemberian *dark chocolate* menyebabkan efek penurunan tekanan darah yang signifikan.

Penelitian Grassi dkk pada subyek hipertensi yang diberikan *dark chocolate* 100 g/hari (88 mg flavanol) dibandingkan dengan pemberian *white chocolate* 90 g/hari selama 15 hari menunjukkan penurunan tekanan darah sistolik dan diastolik yang signifikan pada kelompok yang diberikan *dark chocolate*.¹³ Demikian juga Taubert dkk yang membandingkan pemberian *dark chocolate* 6,3 g/hari dengan *white chocolate* 5,6 g/hari selama 18 minggu pada subyek prahipertensi dan hipertensi derajat 1 juga menunjukkan hasil penurunan tekanan darah sistolik dan diastolik yang bermakna.¹⁴ Di Indonesia belum pernah dilakukan penelitian *dark chocolate* untuk alternatif diet yang menyenangkan dalam menjaga kesehatan terutama dalam menurunkan tekanan darah.

Berdasarkan hal tersebut di atas, maka dilakukan penelitian uji klinik selama 15 hari yang akan dilakukan pada karyawan administrasi laki-laki dan perempuan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Prof. Dr. Moestopo (Beragama)/FKG-UPDM(B) dan PT. Andalan Darma Mulia (ADM) usia 25-44 tahun dengan tekanan darah prahipertensi. Penelitian ini membandingkan kelompok perlakuan yang mendapatkan *dark chocolate* 30 g/hari (86,4 mg flavanol) disertai penyuluhan gizi dengan kelompok kontrol yang mendapat *white chocolate* 25 g/hari (0 mg flavanol) dan penyuluhan gizi. Adapun dosis *dark chocolate* yang digunakan dalam penelitian ini lebih kecil daripada penelitian Grassi dkk tetapi memiliki kandungan zat aktif flavanol yang hampir sama. Parameter yang dinilai adalah kadar NOx serum, tekanan darah sistolik dan diastolik.

I.2. Permasalahan

I.2.1. Identifikasi masalah

1. Tingginya rerata tekanan darah penduduk Indonesia yang meningkat sejalan dengan bertambahnya usia.
2. Prahipertensi merupakan salah satu faktor risiko penyakit kardiovaskular.
3. Gangguan vaskular pada prahipertensi terjadi karena penurunan pembentukan dan bioavailabilitas *nitric oxide*.

I.2.2. Perumusan masalah

Berdasarkan latar belakang di atas maka dapat ditetapkan perumusan masalah sebagai berikut :

Apakah pemberian *dark chocolate* 30 g/hari (86,4 mg flavanol) selama 15 hari berturut-turut disertai penyuluhan gizi pada karyawan administrasi laki-laki dan perempuan FKG-UPDM(B) dan PT. ADM usia 25-44 tahun dengan tekanan darah prahipertensi dapat meningkatkan kadar NO_x serum dan menurunkan tekanan darah sistolik dan diastolik dibandingkan kelompok yang mendapat *white chocolate* 25 g/hari dan penyuluhan gizi ?

I.3. Hipotesis

Pada karyawan administrasi laki-laki dan perempuan FKG-UPDM(B) dan PT. ADM usia 25-44 tahun dengan tekanan darah prahipertensi, pemberian *dark chocolate* 30 g/hari selama 15 hari berturut-turut disertai penyuluhan gizi dapat :

1. meningkatkan kadar NO_x serum
2. menurunkan tekanan darah sistolik
3. menurunkan tekanan darah diastolik

dibandingkan yang mendapat *white chocolate* 25 g/hari selama 15 hari berturut-turut dan penyuluhan gizi.

I.4. Tujuan

I.4.1. Tujuan umum

Untuk mencegah timbulnya hipertensi dan menurunkan risiko penyakit kardiovaskular.

I.4.2. Tujuan khusus

1. Diketuainya karakteristik subyek penelitian berdasarkan jenis kelamin, usia, tingkat pendidikan, aktivitas fisik, indeks massa tubuh, kadar NO_x serum dan tekanan darah pra perlakuan.
2. Diketuainya asupan energi, natrium dan polifenol pada pra perlakuan, H+8 dan pasca perlakuan dengan metoda *food record* (2 kali per minggu).
3. Diketuainya perubahan kadar NO_x serum pra perlakuan dan pasca perlakuan pada kedua kelompok.
4. Diketuainya perubahan tekanan darah sistolik dan diastolik pra perlakuan, H+8 dan pasca perlakuan pada kedua kelompok.

I.5. Manfaat

1. Untuk subyek penelitian
Diharapkan dapat menurunkan tekanan darah guna mencegah penyakit kardiovaskular.
2. Untuk institusi
Diharapkan dapat dipakai sebagai landasan atau bahan rujukan bagi penelitian selanjutnya.
3. Untuk peneliti
Diharapkan dapat menerapkan pengetahuan yang didapat selama kuliah dan melatih cara berpikir serta membuat penelitian dengan metodologi penelitian yang baik dan benar.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Prahipertensi

2.1.1 Definisi prahipertensi

Prahipertensi didefinisikan sebagai tekanan darah sistolik antara 120-139 mm Hg dan/atau diastolik antara 80-89 mm Hg.¹ Diagnosa ditegakkan berdasarkan pengukuran tekanan darah minimal 2 kali pada 2 kunjungan klinik.¹ Klasifikasi tekanan darah berdasarkan JNC-7 dikategorikan dalam tabel di bawah ini :

Tabel 2.1 Klasifikasi Tekanan Darah

Kriteria	Sistolik (mm Hg)	Diastolik (mm Hg)
Normal	<120	<80
Prahipertensi	120-139	80-89
Hipertensi tingkat 1	140-159	90-99
Hipertensi tingkat 2	≥160	≥100
Hipertensi sistolik terisolasi	≥140	<90

Sumber : telah diolah kembali dari Chobanian dkk¹

Prahipertensi terjadi karena peningkatan curah jantung dan atau tahanan perifer. Curah jantung dipengaruhi oleh tekanan vena dan kontraksi otot jantung. Saraf parasimpatis akan mensekresi asetilkolin, yang akan ditangkap oleh reseptor asetilkolin di permukaan sel endotel. Akibatnya sel endotel akan mensintesis dan mensekresi NO, suatu vasodilator yang menyebabkan relaksasi otot polos pembuluh darah. Pada keadaan disfungsi endotel terjadi peningkatan resistensi pembuluh darah. Mekanisme terjadinya prahipertensi berhubungan erat dengan disfungsi endotel pembuluh darah dan penurunan bioavailabilitas NO.¹⁶

2.1.2 Faktor risiko prahipertensi

Obesitas

Prahipertensi berhubungan erat dengan *overweight* dan obesitas, hal ini ditunjukkan dengan peningkatan prevalensi prahipertensi yang berbanding lurus dengan peningkatan epidemik obesitas.¹ Berdasarkan survei *National Health And Nutrition Examination Survey (NHANES) III*, prevalensi tekanan darah tinggi pada BMI >30

kg/m² adalah 42% pada pria dan 38% pada wanita. Risiko peningkatan tekanan darah 2-6 kali lebih tinggi pada kelompok *overweight* dibanding kelompok dengan berat badan normal, mungkin ini disebabkan adanya aktifitas berlebihan dari saraf simpatis, sistem renin-angiotensin dan mekanisme inflamasi yang sering ditemui pada penderita *overweight* dan obesitas.⁴

Usia

Tekanan darah sistolik meningkat sebanding dengan penambahan usia pada umur 20-80 tahun, sedangkan tekanan darah diastolik meningkat hingga usia pertengahan, kemudian akan mengalami penurunan. Tekanan darah sistolik rata-rata meningkat sebesar 0,5 mm Hg pertahun.³ Perubahan anatomi dan fisiologi pembuluh darah diperkirakan menjadi penyebab peningkatan tekanan darah pada penuaan.⁴

Asupan natrium

Studi populasi menunjukkan hubungan positif antara asupan natrium dengan peningkatan tekanan darah. Asupan tinggi natrium menyebabkan gangguan di ginjal untuk mengekskresikan kelebihan natrium sehingga kadar natrium, klorida dan air dalam darah meningkat, akibatnya terjadi peningkatan volume plasma dan curah jantung.⁴

Olahraga

Kurangnya olahraga meningkatkan risiko hipertensi sebesar 30-50%, hal ini disebabkan karena menurunnya aliran darah yang bersifat pulsatil dapat menurunkan produksi NO sehingga terjadi peningkatan tekanan darah.⁴

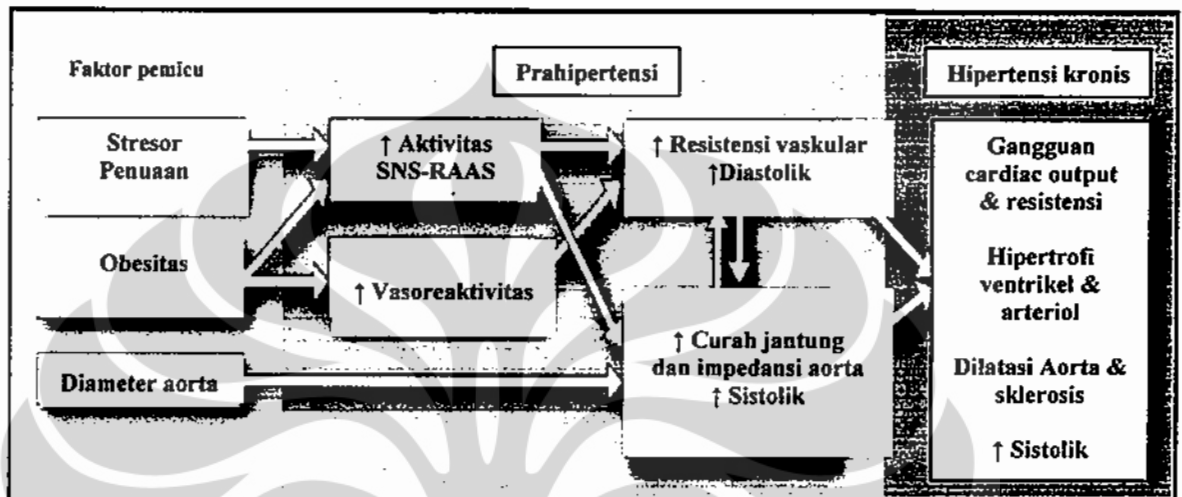
Jenis kelamin

Prahipertensi lebih sering dijumpai pada laki-laki, hal ini disebabkan pembentukan hormon aldosteron dari progesteron yang berperan meningkatkan absorpsi natrium dari ginjal. Selain itu terdapat faktor lain penyebab prahipertensi seperti kebiasaan merokok, asupan alkohol berlebihan, hiperkolesterolemia dan adanya kerusakan organ target.⁴

2.1.3 Patofisiologi prahipertensi

Tekanan darah ditentukan oleh dua faktor utama, yaitu curah jantung dan resistensi perifer.^{4,17} Penuaan, stresor lingkungan dan obesitas merangsang aktivasi aksis simpatis-renin-angiotensin, yang menyebabkan peningkatan curah jantung dan resistensi vaskular. Dislipidemia dan resistensi insulin yang sering ditemukan pada

obesitas meningkatkan vasoreaktivitas, sedangkan diameter aorta yang kecil secara independen menyebabkan peningkatan impedansi aorta dan tekanan nadi. Mekanisme prahipertensi berkontribusi pada hipertensi sistolik kronis, dimana terjadi perubahan struktur vaskular dan jantung.³ Mekanisme prahipertensi dapat terlihat pada gambar di bawah ini.



Keterangan :

SNS-RAAS : *sympathetic nervous system-renin-angiotensin-aldosterone system*.

Gambar 2.1 Patofisiologi prahipertensi

Sumber : telah diolah kembali dari Izzo JL³

2.1.4 Risiko penyakit kardiovaskular pada prahipertensi

Penelitian tahun 1999-2000 oleh NHANES menunjukkan bahwa 64% pasien prahipertensi memiliki ≥ 1 faktor risiko PKV, persentase ini meningkat menjadi 94% pada usia ≥ 60 tahun. Risiko mengalami obesitas, dislipidemia, resistensi insulin, sindrom metabolik dan diabetes lebih besar pada kelompok prahipertensi dibanding kelompok normotensif.¹

Dibanding dengan tekanan darah normal, prahipertensi berhubungan dengan peningkatan 27% kematian karena semua penyebab dan 66% kematian yang disebabkan PKV. Berdasarkan *follow up* lebih dari 20 tahun oleh studi kohort NHANES-I 3,4% perawatan di rumah sakit, 6,5 % perawatan di rumah dan 9,1% kematian disebabkan oleh prahipertensi. Hal ini disebabkan karena prahipertensi berhubungan dengan aterosklerosis subklinis, termasuk peningkatan aterosklerosis koroner dan penebalan intima media arteri karotis dan brakial. Selain itu prahipertensi juga berhubungan dengan peningkatan *C-Reactive Protein* (CRP), *Tumor Necrosis Factor α* (TNF- α), homosistein, oksidasi LDL dan berbagai marker inflamasi lainnya.^{1,18,19}

2.1.5 Terapi nonfarmakologis prahipertensi

Tujuan terapi prahipertensi adalah untuk menurunkan tekanan darah ke kisaran normal, mencegah peningkatan tekanan darah dengan bertambahnya umur dan mencegah PKV yang berhubungan dengan peningkatan tekanan darah.^{18,19} JNC-7 merekomendasikan terapi nonfarmakologis untuk penderita prahipertensi, yang terdiri atas 5 macam terapi. Berbagai penelitian menunjukkan efek penurunan tekanan darah dengan penerapan terapi ini.¹

Tabel 2.2. Terapi nonfarmakologis prahipertensi

Strategi	Rekomendasi	Efek TDS pada prahipertensi	Efek pada insiden/prevalensi hipertensi
Diet DASH	4-5 porsi buah/hari 4-5 porsi sayuran/hari 2-3 produk rendah lemak/hari <25% lemak	3,5 mm Hg	penurunan 62% (prevalensi)
Penurunan berat badan	menurunkan tekanan darah Walau tidak capai IMT normal	1 mm Hg/kg	penurunan 42% (insiden)
Menurunkan asupan natrium	< 2400 mg/hari	penurunan BB 2 mm Hg/76 mmol/L penurunan perhari	penurunan 38% (insiden)
Aktifitas fisik	Olahraga ≥30 menit/hari	3-4 mm Hg	tidak diketahui
Membatasi asupan alkohol	≤2 oz/hari (pria); ≤1 oz/hari (wanita)	3,5 mm Hg	tidak diketahui

Sumber : telah diolah kembali dari Engler dkk¹⁰

2.2 Nitric Oxide (NO)

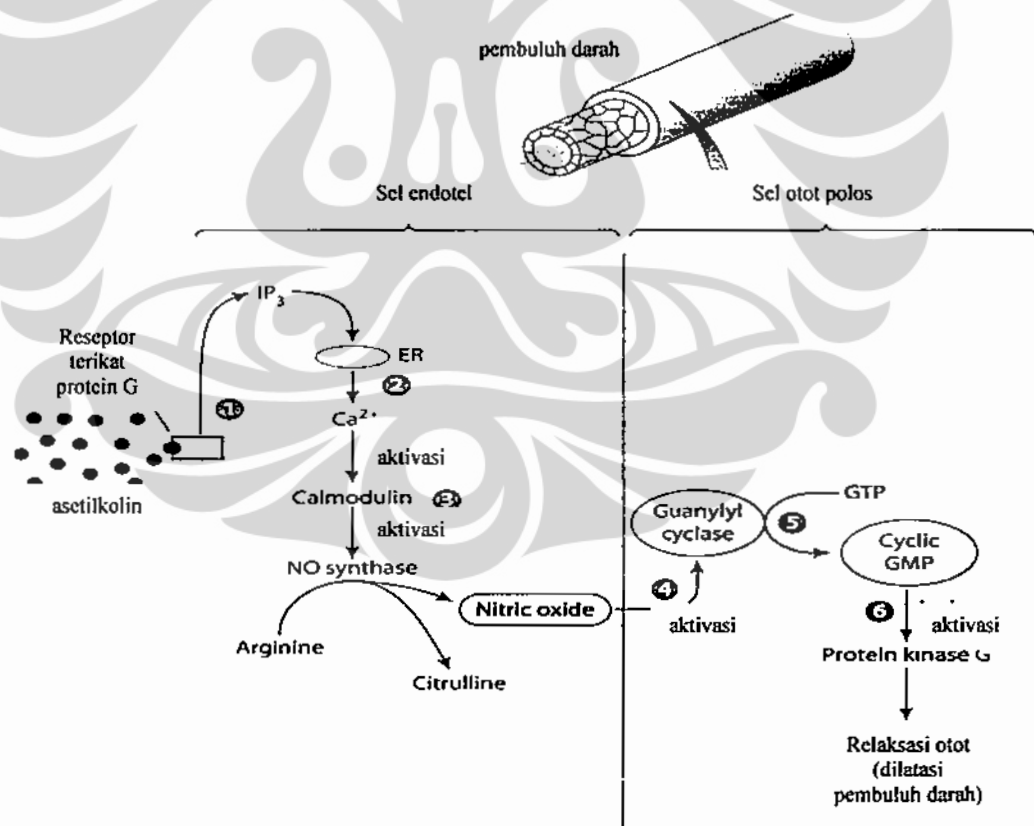
Nitric oxide diproduksi di endotel dan berperan dalam menjaga tonus vaskular. Pelepasan NO distimulasi oleh neurotransmitter, hormon, keping darah dan stres di pembuluh darah. Pada penderita prahipertensi terjadi penurunan kadar NO yang signifikan yang menandakan disfungsi endotel.²⁰

NO memiliki efek anti- dan proinflamasi; efek antiinflamasi ditemukan jika NO dalam kadar normal, sedangkan efek proinflamasi terjadi pada kadar NO yang berlebihan. Produksi NO yang berlebihan disebabkan oleh endotoksemia, syok septik, dan peningkatan permeabilitas vaskular intestinal.²¹

2.2.1 Biosintesis Nitric Oxide (NO)

Nitric oxide synthase (NOS) terdiri atas 3 jenis, dinamakan berdasarkan aktifitas dan jaringan tempat asalnya, yaitu *neuronal NOS* (nNOS/NOS 1), *inducible NOS* (iNOS/NOS 2) dan *endotel NOS* (eNOS).²² Dalam kondisi normal, NO diproduksi terus menerus dalam jumlah kecil sesuai dengan kebutuhan tubuh.²³ Saat inflamasi, jumlah produksi NO oleh iNOS dapat meningkat 1000 kali lipat dibanding kondisi normal.

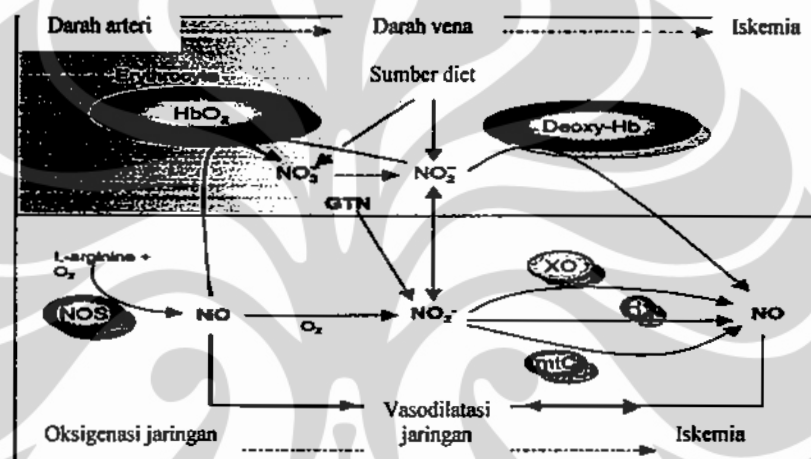
NOS merupakan enzim yang kompleks dan memerlukan 5 kofaktor redoks: NADPH, FAD, FMN, *heme* dan *tetrahydrobiopterin* (BH₄) dan arginin sebagai substrat. Biosintesis NO dimulai saat asetilkolin berikatan dengan reseptor protein G yang menyebabkan peningkatan produksi IP₃ (gambar 2.2 no.1). IP₃ merangsang penglepasan ion kalsium dari retikulum endoplasmik (gambar 2.2 no.2). Ion Ca²⁺ dan calmodulin membentuk kompleks yang akan menstimulasi NOS untuk memproduksi NO (gambar 2.2 no.3).²³



Gambar 2.2 Mekanisme biosintesis dan efek vasodilatasi NO

Sumber : telah diolah dari Principles of cell Biology²⁴

Nitric oxide memiliki waktu paruh yang sangat singkat ($\pm 1-2$ mili detik) karena cepat dipakai oleh sel endotel pembuluh darah sebagai vasodilator.²⁵ *Nitric oxide* segera dioksidasi menjadi nitrit yang kemudian akan berikatan dengan hemoglobin membentuk nitrat. Nitrit dapat direduksi menjadi NO oleh enzim *xanthine oxidoreductase* (XO) sebagai katalisator dan penambahan proton (H^+) di sitokrom mitokondria (gambar 2.3). Waktu paruh nitrit (1-5 menit) lebih pendek daripada nitrat (5-8 jam). Kadar nitrat, nitrit dan NO dalam plasma darah berbanding lurus dengan waktu paruhnya.²⁶



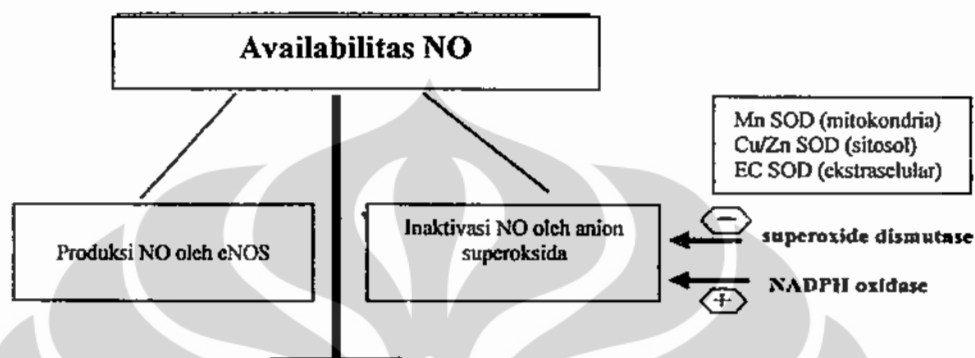
Gambar 2.3. Pembentukan NO Dalam Darah dan Jaringan
Sumber : telah diolah kembali dari Lundberg dkk²⁶

2.2.2 Nitric Oxide (NO) sebagai vasodilator

Nitric Oxide yang terbentuk berdifusi dari endotel ke otot polos (gambar 2.2 no. 4), kemudian akan berikatan dan mengaktifasi *guanylate cyclase*, menghasilkan peningkatan kadar *cyclic guanine monophosphate/cGMP* (gambar 2.2 no.5).²⁸ Ikatan NO dengan heme dari hemoglobin dan heme dari enzim *guanylyl cyclase*, menyebabkan NO akan berdifusi dengan cepat ke dalam darah. *Cyclic guanine monophosphate* akan mengaktifasi protein kinase G yang menyebabkan relaksasi otot polos (gambar 2.2 no.6) dengan cara : 1) menghambat masuknya kalsium ke dalam sel dan menurunkan konsentrasi kalsium intraseluler; 2) mengaktifasi kanal K^+ yang akan menimbulkan hiperpolarisasi dan relaksasi; 3) menstimulasi protein kinase tergantung cGMP yang mengaktifasi *myosin light chain phosphatase*, enzim yang mendefosforilasi rantai miosin dan menyebabkan relaksasi otot polos.²⁵

2.2.3 Disfungsi endotel

Disfungsi endotel berperan penting dalam patogenesis PKV seperti aterosklerosis, stroke, diabetes, perdarahan subaraknoid dan hipertensi.²⁸ Disfungsi endotel disebabkan oleh gangguan bioavailabilitas NO yang ditentukan oleh produksi NO dan aktivasi NO seperti terlihat di gambar 2.4.⁶

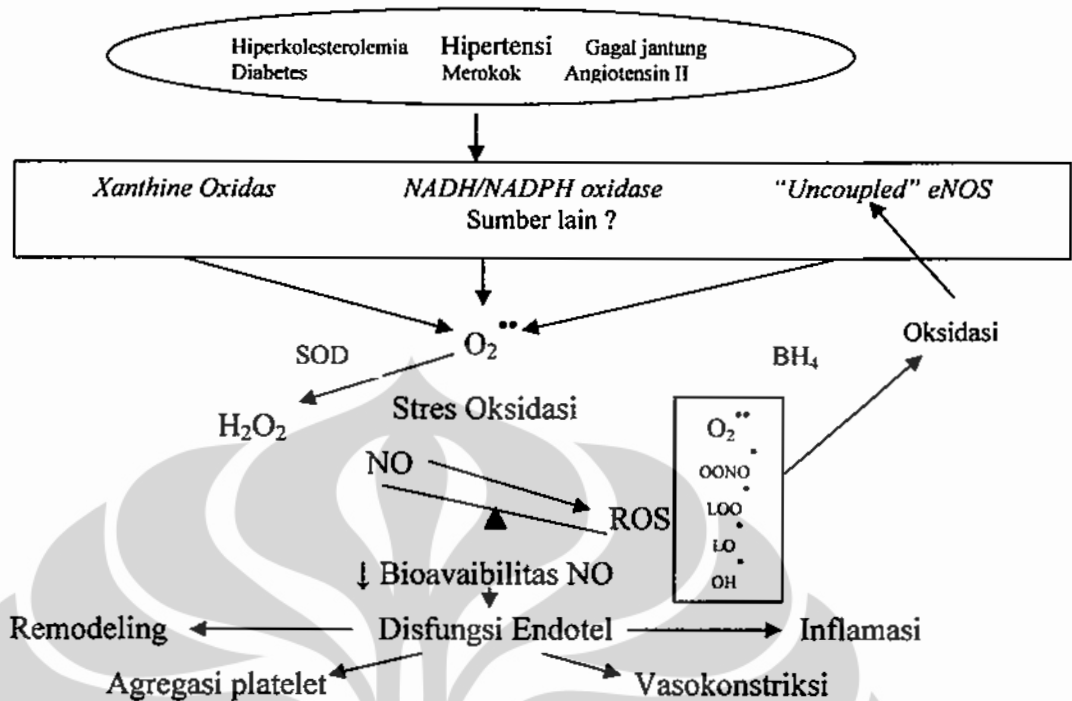


Gambar 2.4. Pengaturan bioavailabilitas NO

Sumber : telah diolah kembali dari Drexler⁶

Peningkatan stres oksidatif akan menurunkan bioavailabilitas NO yang ditandai dengan penurunan produksi NO atau peningkatan degradasi NO.²⁹ Stres oksidatif juga meningkatkan inhibitor eNOS dan menurunkan respon jaringan terhadap NO.^{24,30} Penurunan bioavailabilitas NO akan menyebabkan gangguan *endothelium dependent vasorelaxation* sehingga akan menimbulkan peningkatan tekanan darah.³¹

Anion superoksida memiliki afinitas yang tinggi terhadap NO karena kedua molekul memiliki elektron yang tidak berpasangan yang membuatnya menjadi sangat reaktif. Sintesis kedua spesies ini oleh enzim yang sama akan menghasilkan peroksinitrit (ONOO⁻) yang akan terurai dan membentuk radikal aktif OH.²⁷



Gambar 2.5. Bioavailabilitas NO dan Disfungsi Endotel

Sumber : telah diolah kembali dari Cai dkk³²

2.3 DARK CHOCOLATE

Cokelat berasal dari biji *cocoa* – buah dari pohon *cacao* atau *Theobroma cacao* (Latin: makanan dewa-dewa). Buah *cocoa* panjangnya 15-25 cm, sedangkan biji *cocoa* berbentuk oval datar, panjang 2-3 cm dan lebar 1,5 cm (gambar 2.6)³³



Gambar 2.6. Buah dan biji *cocoa*

Sumber : Kelishadi dkk³³

2.3.1 Proses pembuatan *cocoa* dan cokelat

Kualitas *cocoa* dan cokelat ditentukan oleh kualitas biji *cocoa* dan proses produksi. Setelah dipanen, biji *cocoa* difermentasikan selama 3-9 hari pada suhu <60°C

kemudian dipanggang pada suhu 100-140°C. Proses fermentasi dan pemanggangan menimbulkan rasa dan aroma khas *cocoa*. Selanjutnya biji *cocoa* digiling menghasilkan *cocoa liquor*, ini adalah dasar produk-produk cokelat. Cokelat paling baik disimpan di tempat yang bersuhu 16-25°C, kelembaban <50%, bebas bau dan tidak terkena sinar matahari dan panas.³³

Cokelat terdiri atas beberapa jenis; 1. *Dark chocolate*, mengandung $\pm 70\%$ *cocoa*; 2. Cokelat susu, mengandung $\pm 10-30\%$ *cocoa* dan susu dan 3. Cokelat putih yang tidak mengandung *cocoa*, hanya gula, susu, dan zat lain.^{12,34}

2.3.2 Kandungan nutrisi

Cocoa dan cokelat merupakan sumber makanan tinggi kalori, dalam 100 g coklat mensuplai 470-528 kkal.³³ Tergantung dari tipe dan proses produksi, cokelat mengandung 20-75% karbohidrat, 15-49% lemak, 4-10% protein dan ± 6 g serat.¹⁵ *Cocoa* dan *dark chocolate* hanya mengandung sedikit protein larut sehingga untuk meningkatkan kadarnya diberikan penambahan susu.³⁴

Tabel 2.3. Kandungan nutrisi dalam cokelat

	Cokelat susu	White chocolate	Dark chocolate
Takaran saji	28,6 g	28,6 g	28,6 g
Kalori	157	162	150
Protein	1,7 g	2 g	1,7 g
Total lemak	10 g	10,58 g	10 g
Lemak jenuh	6 g	6,57 g	6 g
Cholesterol	5 g	8,58 g	0,28 g
Serat	0,57 g	0	3,14 g
Karbohidrat	15,44 g	14,87 g	13,15 g
Gula	15,15 g	14,87 g	12,58 g
Natrium	26,8 mg	31 mg	29,5 mg
Kalium	98 mg	97 mg	153 mg
Kalsium	52 mg	78 mg	9,1 mg
Vitamin E	128 mg	147 mg	102,49 mg
Riboflavin	84 mg	118 mg	32,3 mg

Sumber : telah diolah kembali dari Afoakwa dkk³³

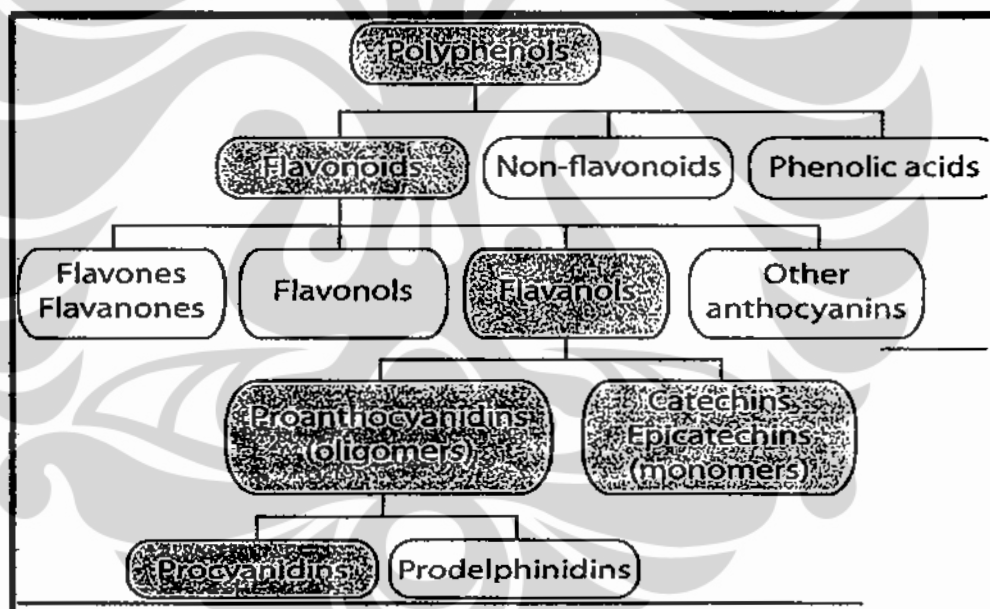
Cocoa dan *dark chocolate* tidak mengandung kolesterol. Lemak dalam cokelat (*cocoa butter*) mengandung 60% asam lemak jenuh (35% asam stearat dan 25% asam palmitat), 35% *monounsaturated fatty acid*/MUFA (terutama asam oleat) dan

5% *polyunsaturated fatty acid*/PUFA (3% *linoleic acid* dan 2% *α-linolenic acid*). Asam oleat memiliki efek perlindungan terhadap kardiovaskular, demikian juga asam stearat karena asam stearat cepat mengalami desaturasi menjadi asam oleat. Asam stearat sulit diabsorpsi dan cenderung diekskresikan melalui feses.³⁵ Berdasarkan penelitian terakhir, asam stearat memiliki efek penurunan LDL dan meningkatkan HDL.³³

Vitamin yang terdapat dalam *cocoa* atau cokelat antara lain vitamin A, B kompleks, D dan vitamin E. Selain itu *cocoa* dan cokelat merupakan sumber mineral seperti magnesium, kalium, fosfor, besi dan kromium.³³

2.3.3 Zat aktif

Cocoa merupakan sumber utama polifenol, yaitu golongan flavonoid subkelas flavanol (*Flavan-3-ols*).⁸ Flavanol terdiri atas bentuk monomer (*epicatechin*, *catechin*), dan polimer *procyanidin*.^{36,37}



■ Polifenol dalam *cocoa*/cokelat

Gambar 2.7. Klasifikasi polifenol

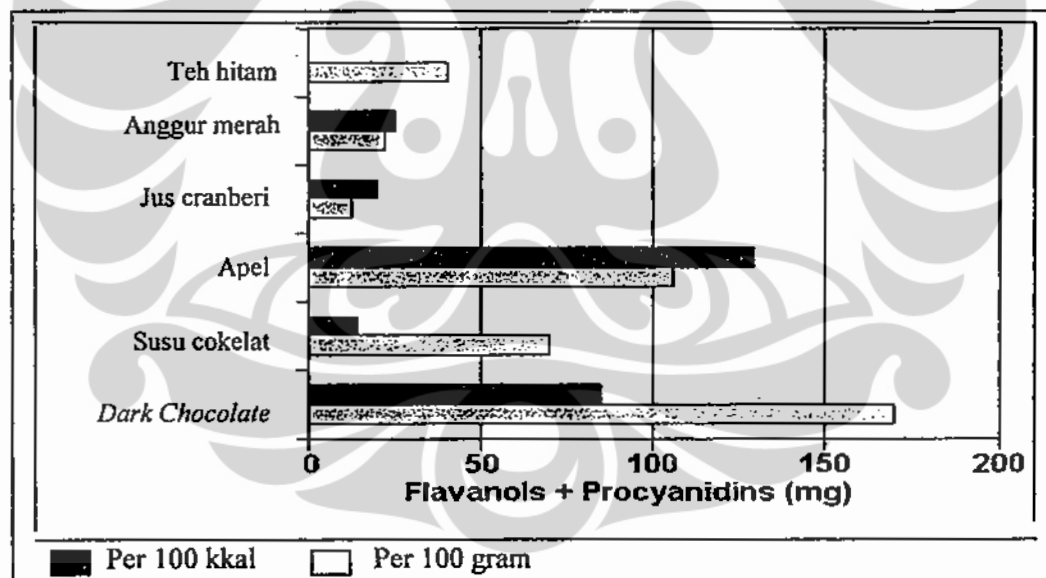
Sumber : Rios dkk³⁷

Kandungan polifenol dalam cokelat bervariasi antara 5-8,4 mg/g tergantung dari jenis cokelat. *Procyanidin* flavanol merupakan polifenol utama di *cocoa* (>90% dari total polifenol) sedangkan monomer hanya 5-10%.^{12,38}

Tabel 2.4. Polifenol dalam makanan

	Sumber (ukuran saji)	Kandungan polifenol	
		mg/kg berat	mg/saji
Monomerik flavanol			
<i>Catechin</i>	} Cokelat (50 g)	460-610	23-30
<i>Epicatechin</i>			
	Kacang (200 g)	350-550	70-110
	Aprikot (200 g)	100-250	20-50
	Cheri (200 g)	50-220	10-44
	Anggur (200 g)	30-175	6-35
	Peach (200 g)	50-140	10-28
	Blackberry (100 g)	130	13
	Apel (200 g)	20-120	4-24
	Teh hijau (200 ml)	100-800	20-160
	Teh hitam (200 ml)	60-500	12-100
	Anggur merah (100 ml)	80-300	8-30
	Jus apel (200 ml)	40	8

Sumber : telah diolah kembali dari Manach⁸



Gambar 2.8. Kandungan flavanol dan *procyanidin* dalam *dark chocolate* dibandingkan bahan makanan sumber lain

Sumber : telah diolah kembali dari Ding dkk³⁹

Tabel 2.5. Komposisi flavanoid dalam *cocoa* atau *dark chocolate* (mg/g)

(-)- <i>Epicatechin</i>	0,07 – 1,94
(+)- <i>Catechin</i>	0,04 – 0,52
Procyanidin B2	0,04 – 1,17
Procyanidin B5	0,00 – 0,24

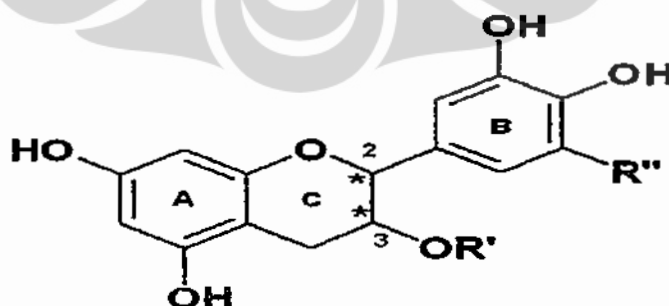
Sumber : telah diolah kembali dari Hopper⁴⁰

Selain polifenol, coklat juga mengandung *methylxantines*, antara lain *Theobromine*, *Caffein*, *Phenylethylamine* dan *Tryptophan*.³³ *Methylxantines* terbanyak dalam *cocoa* adalah *theobromine* (2-3%) dan *caffein* (0,2%) yang memiliki efek diuretik. *Dark chocolate* mengandung *theobromine* dan *caffein* yang lebih tinggi dibanding produk coklat lain karena mengandung konsentrasi *cocoa* yang lebih tinggi.¹²

Cocoa dan produk *cocoa* mengandung magnesium dalam jumlah yang tinggi. Berdasarkan *Dietary Reference Intakes* (DRI) magnesium untuk laki-laki dan perempuan usia 30-71 tahun, dalam setiap takaran sajinnya (44 g) *dark chocolate* menyuplai 12% DRI. Magnesium merupakan mineral yang penting dalam regulasi tekanan darah. Berdasarkan penelitian, asupan magnesium dari makanan berhubungan terbalik dengan tekanan darah dibandingkan asupan dari suplemen.¹²

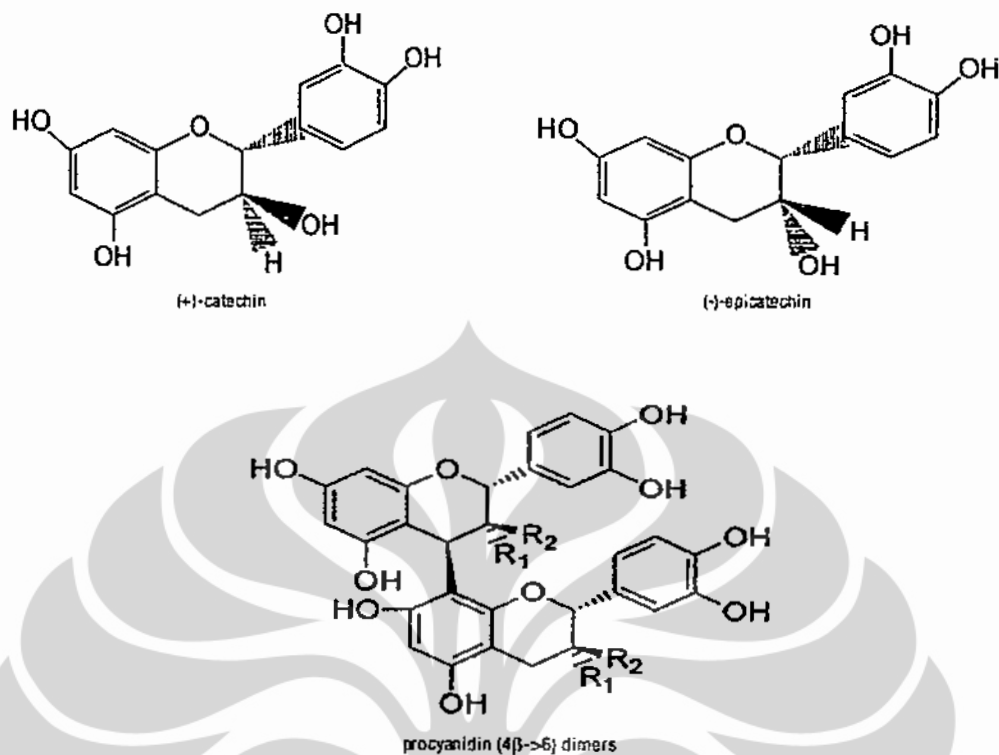
2.3.4 Sifat fisika & kimia

Fermentasi dan alkalisasi pada proses produksi *cocoa* menurunkan kadar flavanol.¹² Flavanoid *cocoa* dipertahankan sebesar 70-95% jika panas dan alkalisasi diminimalkan, sedangkan proses produksi secara tradisional hanya mempertahankan kadar total flavanol *cocoa* sebesar 50-75%.³⁹



* mengindikasikan pusat chiral yang terdapat pada posisi C₂ dan C₃ cincin C.

Gambar 2.9. Struktur dasar flavanols
Sumber : telah diolah kembali dari Afoakwa dkk³⁵



Gambar 2.10. Struktur kimia catechin, epicatechin dan procyanidin
 Sumber : telah diolah kembali dari Afoakwa dkk³⁵

2.3.5 Absorpsi, transpor, metabolisme dan ekskresi

Banyak hal tentang mekanisme absorpsi polifenol yang belum diketahui.⁸ Polifenol, umumnya mempunyai ikatan glikosida yang tidak bisa diabsorpsi di usus dan membutuhkan mikroflora kolon. Monomer flavanol merupakan suatu aglikon dan bersifat hidrofilik sehingga dapat diabsorpsi dan berdifusi secara pasif sepanjang usus halus.³⁸ Setelah masuk ke sirkulasi mesenterik, umumnya flavanol ditemukan dalam bentuk terkonjugasi. Flavanol diabsorpsi dari lumen yeyunum kemudian masuk ke lapisan sel epitel, setelah itu akan mengalami proses konjugasi yang terdiri dari metilasi, glukuronidasi dan sulfasi yang akan berlanjut di hepar. Proses ini merupakan proses detoksifikasi untuk membatasi efek toksisitas dan meningkatkan sifat hidrofilik agar lebih mudah dieliminasi melalui empedu dan urin.^{36,38}

Flavanol *procyanidin*, karena sifatnya yang oligomer dan polimer tidak mengalami depolarisasi di lambung dan masuk ke usus halus dalam bentuk utuh.⁴¹ Di kolon, *rocyanidin* mengalami katalisis oleh mikroflora kolon dan mengalami 2 jalur metabolisme; 1) absorpsi dalam bentuk intak melalui epitel kolon kemudian masuk

ke dalam aliran darah, 2) didegradasi menjadi bentuk struktur fenolik yang lebih sederhana, yaitu *m-hydroxyphenylpropionic acid*, *3,4-dihydroxyphenylacetic acid*, *m-hydroxyphenylacetic acid* dan *m-hydroxybenzoic acid*.²⁹

Epicatechin dan *catechin* ditemukan di plasma 0,5-1 jam setelah mengonsumsi *cocoa* dan mencapai puncaknya dalam 1-2 jam, dan menghilang dari plasma setelah 6 jam.^{42,43} Konsentrasi plasma dari polifenol *cocoa* umumnya hanya dalam nanomolar atau mikromolar rendah.²⁹ Tetapi jumlah tersebut cukup untuk menunjukkan efek biologisnya.⁴²

Metabolit monomer *flavanol* berupa derivat *O-methylated*, *O-glucuronidated* dan *O-sulfated*, terutama *4'-O-methyl-epicatechin-O-β-D-glucuronides* dengan konsentrasi di plasma mencapai 1-2 μM. Asam fenolik yang merupakan hasil metabolisme *procyanidin* oleh mikroflora kolon dapat dideteksi 9 jam setelah konsumsi *cocoa*.³⁶

Metabolit *flavanol* berikatan dengan albumin di dalam darah. Kuatnya ikatan dengan albumin akan mempengaruhi laju klirens metabolit dan penghantarannya ke sel dan jaringan. Perubahan pH dapat menyebabkan perubahan konformasi albumin yang menimbulkan disosiasi kompleks ligan-albumin.⁸

Polifenol dan derivatnya dieliminasi melalui urin dan empedu. Polifenol disekresikan melalui jalur bilier ke dalam duodenum, dimana akan diproses oleh enzim bakteri, terutama *β-glucuronidase* di bagian distal usus, setelah itu akan mengalami reabsorpsi. Proses daur ulang enterohepatik ini memperpanjang keberadaan polifenol di dalam tubuh.⁸

2.3.6 Bioavailabilitas

Bioavailabilitas *flavanol* dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti absorpsi di usus, metabolisme oleh mikroflora, metabolisme intestinal dan hepatic, plasma kinetik, sifat dari metabolit di sirkulasi, ikatan dengan albumin, ambilan seluler, metabolisme intraselular, akumulasi di jaringan dan ekskresi bilier dan urin.⁸

Interaksi antara *flavanol* dan beberapa komponen dalam makanan, seperti ikatan dengan protein dan polisakarida juga dapat mempengaruhi absorpsi dan bioavailabilitasnya.⁸ Selain itu bioavailabilitas *flavanol* juga dipengaruhi efek tidak

langsung dari diet terhadap fungsi fisiologis usus (pH, fermentasi usus, waktu transit, dll).^{8,12}

Enzim dan *carrier* yang berperan dalam absorpsi dan metabolisme flavanol dapat dipengaruhi oleh adanya mikronutrien atau xenobiotik. Beberapa penelitian menyatakan bahwa konsumsi semua jenis makanan dapat membatasi bioavailabilitas, sedangkan ingesti flavanol tanpa matriks makanan dapat meningkatkan bioavailabilitasnya. Dengan demikian disarankan untuk mengonsumsi cokelat terpisah dari makanan lainnya.⁸

2.3.7 Fungsi

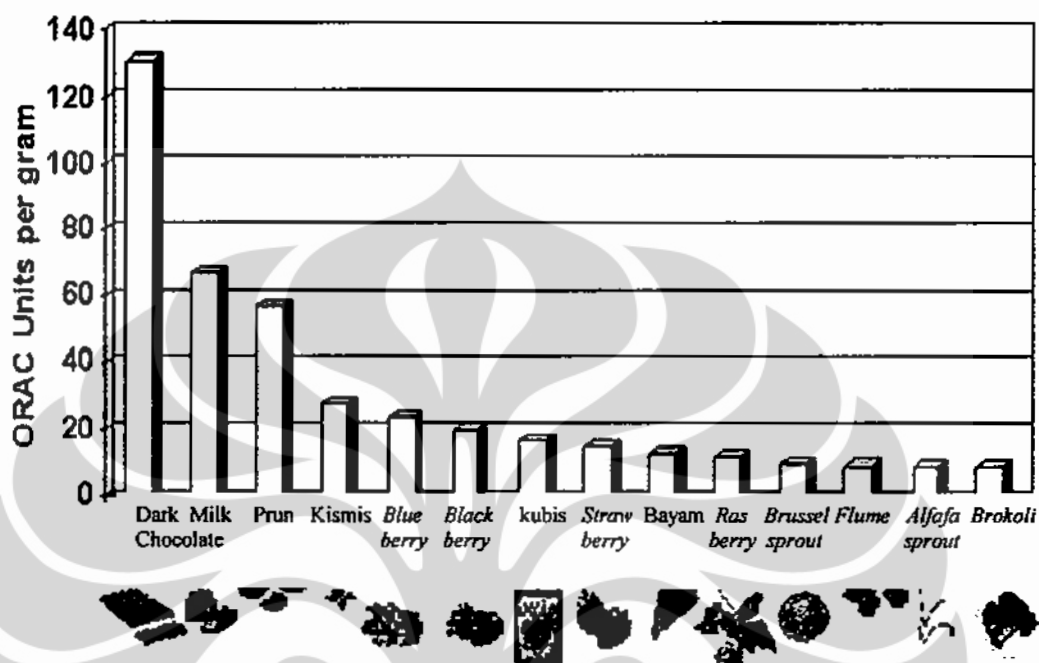
Fungsi biologis *cocoa* terutama berasal dari polifenolnya, walaupun komponen lain seperti *methylxantines*, vitamin dan mineral juga berperan. Monomer flavanol dapat langsung menunjukkan efek biologisnya, sedangkan efek biologis *Procyanidin* mungkin tidak berasal dari pengaruh bentuk intaknya tetapi dari metabolitnya yang lebih mudah diabsorpsi.^{8,29,39}

Efek proteksi kardiovaskular flavanol cokelat disebabkan oleh kemampuannya untuk memperbaiki fungsi endotel, dengan mengaktivasi sistem sintesis NO dan sifat antioksidan, memodulasi fungsi imun dan inflamasi dan kemampuan menurunkan pembekuan darah dengan menghambat aktivasi dan agregasi platelet. Efek proteksi kardiovaskular secara langsung atau tidak langsung akan menyebabkan penurunan tekanan darah.^{40,42,44}

Dark chocolate memiliki sifat antioksidan tertinggi dibanding bahan makanan lain berdasarkan pengukuran ORAC (gambar 5).^{11,33} Fungsi antioksidan dari flavanol berhubungan erat dengan struktur kimianya, gugus *catechol* pada cincin B dapat menangkap radikal bebas dan mengkelasi metal yang bersifat redoks-aktif.^{12,37} *Epicatechin* dapat meningkatkan aktivitas antioksidan dalam plasma dan meningkatkan kapasitas antioksidan total di plasma.¹² Polifenol merupakan satu-satunya antioksidan yang berasal dari diet di kolon.^{8,45} Flavanol *procyanidin* merupakan pelindung yang efektif untuk mencegah oksidasi peroksinitrit dan reaksi nitrosasi.^{29,46} Flavanol tidak hanya memiliki efek antioksidan langsung, tetapi juga memiliki efek penghematan terhadap antioksidan lain seperti vitamin C dan E. Umumnya kadar plasma vitamin C menurun sangat cepat sedangkan vitamin E

menurun secara lambat, *epicatechin* akan memperlambat penurunan kadar vitamin C dan E di plasma.³⁰

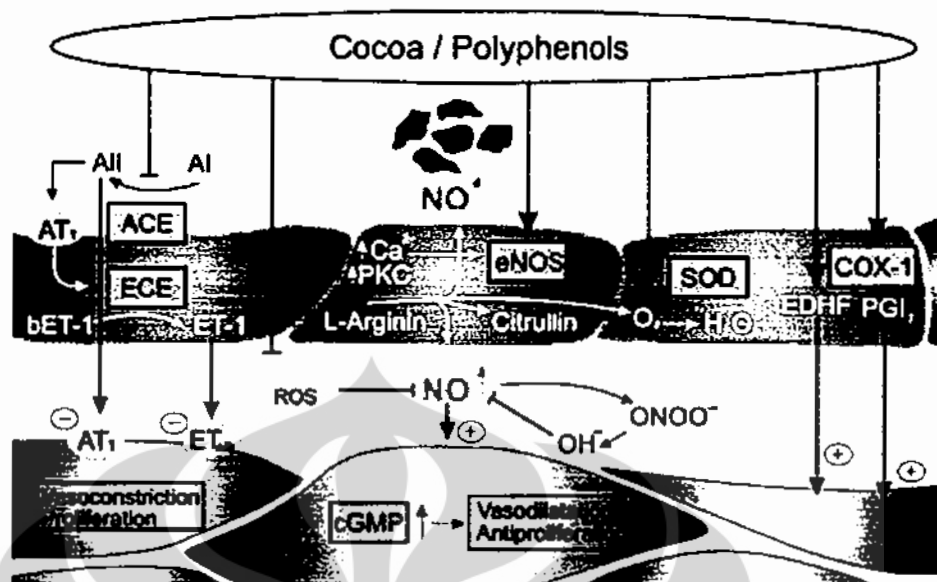
Top Antioxidant Foods



Gambar 2.11. Kandungan antioksidan dalam bahan makanan berdasarkan Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)

Sumber : telah diolah kembali dari Engler¹¹

Belum jelas bagaimana flavanol bereaksi dengan sistem biologis untuk meningkatkan bioavailabilitas NO. Signal mediasi insulin mungkin salah satu mekanismenya, karena insulin dapat memodulasi beberapa molekul signal yang berperan dalam regulasi sintesa NO. Mekanisme kedua adalah signal sel oksidatif, karena flavanol dapat memodulasi stres oksidatif dan tingkat redoks sel sehingga akan meningkatkan availabilitas NO dan aktifitas sintase NO. *Dark chocolate* menginhibisi aktifitas NADPH-oksidase penghasil anion superoksida yang akan mengoksidasi NO menjadi peroksinitrit.⁴⁷ *Cocoa* menghambat aktifitas arginase yang berkompetisi dengan sintesa endotel NO. Inhibisi aktifitas arginase akan meningkatkan kadar NO endotel yang akan menimbulkan relaksasi vasodilatasi endotel.⁴⁵



Gambar 2.12. Pengaruh *cocoa* polifenol terhadap NO endotel
Sumber : telah diolah kembali dari Corti dkk⁴⁹

Mekanisme vasodilatasi *cocoa* berhubungan dengan peningkatan *epicatechin* dalam plasma yang memberikan signal untuk melepaskan komponen vasoaktif dari endotel, diantaranya NO dan prostasiklin.¹¹ Hal ini menyebabkan menurunnya rasio *leukotriene-prostacyclin* sehingga terjadi vasodilatasi vaskular.^{30,45}

2.3.8 Dosis & Toksisitas

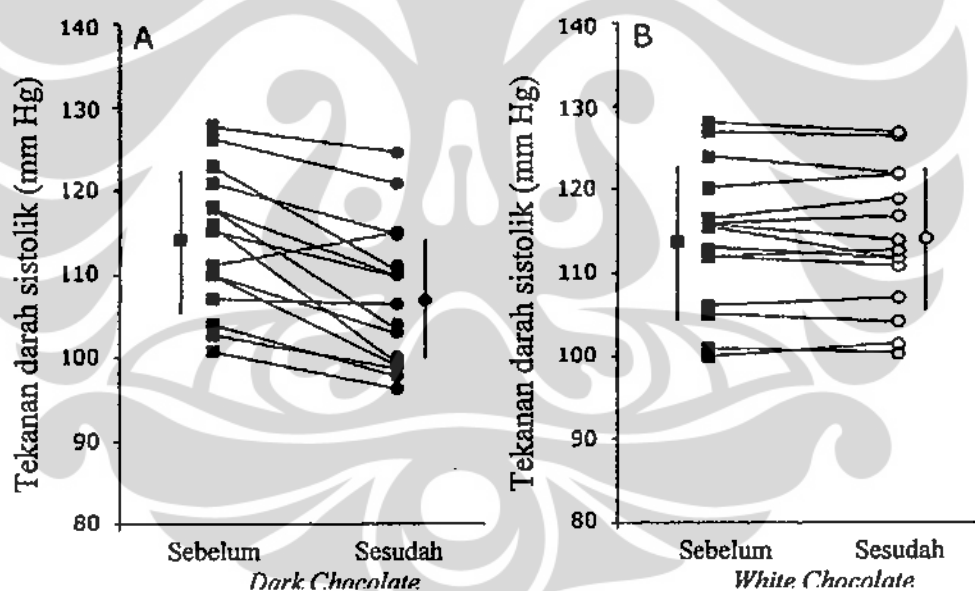
Berdasarkan *Zutphen Elderly Study* dianjurkan untuk mengkonsumsi *cocoa* 4,2 gr/hari (± 10 g/hari).⁴⁸ United States Food and Drug Administration merekomendasikan untuk mengonsumsi *dark chocolate* 40 g/hari.⁴⁹

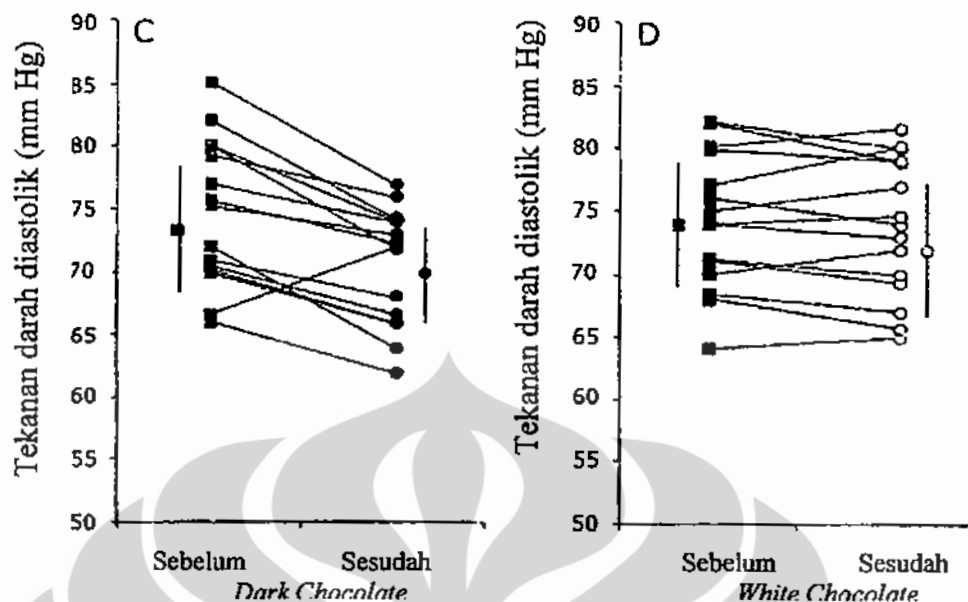
Dosis toksik *cocoa* belum jelas. Kandungan *Caffein* dan *Theobromine* dalam *cocoa* dapat merelaksasikan sfingter esofagus sehingga tidak dianjurkan untuk diberikan pada penderita *heartburn*. Konsumsi *cocoa* dihubungkan dengan beberapa reaksi alergi, seperti dermatitis atopik, tetapi hal ini disebabkan karena kandungan kacang dalam cokelat. Konsumsi *cocoa* juga diduga dapat menimbulkan efek samping seperti hiperaktifitas pada anak, migrain dan *tension headaches* walau hal ini masih bersifat kontroversial.^{33,34}

2.4 PENGARUH *DARK CHOCOLATE* TERHADAP TEKANAN DARAH DAN *NITRIC OXIDE*

Pada hipertensi terjadi disfungsi endotel dan penurunan mekanisme aktivitas antioksidan. *Dark chocolate* dengan kandungan flavanolnya memiliki fungsi perbaikan endotel dan merupakan antioksidan tertinggi dari bahan makanan sumber.³⁶

Grassi, dkk melakukan penelitian terhadap 15 subyek sehat. Setelah periode *wash out* selama 7 hari, subyek dibagi menjadi 2 kelompok untuk menerima 100 g *dark chocolate* (500 mg polifenol) atau 90 g *white chocolate* (0 polifenol) selama 15 hari. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian *dark chocolate* secara bermakna menurunkan tekanan darah sistolik dibanding kelompok yang diibarkan *white chocolate* ($107,5 \pm 8,6$ dibanding $113,9 \pm 8,4$ mm Hg; $P < 0,05$) seperti terlihat pada gambar 2.13.⁵⁰





Gambar 2.13. Efek konsumsi *dark chocolate* dan *white chocolate* terhadap tekanan darah sistolik dan diastolik pada 15 orang subyek sehat.

Sumber : telah diolah kembali dari Grassi dkk⁵⁰

Selanjutnya Grassi, dkk melakukan penelitian pada subyek hipertensi derajat 1 dengan metode yang sama, tetapi dalam 100 g *dark chocolate* mengandung 88 mg flavanol. Tekanan darah diukur dengan *Noninvasive 24-hour Ambulatory Blood Pressure Monitor* (ABPM) pada awal dan akhir periode. Hasil penelitian menunjukkan adanya penurunan tekanan darah sistolik dan diastolik secara bermakna pada kelompok *dark chocolate* ($P < 0,0001$).¹³

Tabel 2.6. 24 jam *Ambulatory Blood Pressure Monitoring* (ABPM) sebelum dan sesudah perlakuan selama 15 hari dengan *dark chocolate* atau *white chocolate* terhadap 20 penderita hipertensi essensial.

Karakteristik Tekanan Darah (mm Hg)	<i>Dark Chocolate</i>		<i>White Chocolate</i>	
	Sebelum	Sesudah	Sebelum	Sesudah
24 jam tekanan darah sistolik ABPM	135,5±5,8	123,6±6,3	135,6±5,5	134,7±4,7
24 jam tekanan darah distolik ABPM	88,0±4,1	79,6±5,4	87,6±4,3	87,5±4,6
Tekanan darah sistolik siang hari ABPM	141,3±4,8	129,3±5,7	141,1±5,4	140,4±4,6
Tekanan darah sistolik malam hari ABPM	120,2±11,6,8	108,7±9,1	120,9±11	119,4±10,2
Tekanan darah diastolik siang hari ABPM	92,4±3,8	84,6±5,6	91,8±4,7	91,6±4,7
Tekanan darah diastolik malam hari ABPM	76,2±6,3	66±7	76,4±6,1	76,4±5,7

Data dalam mean ± SD

* $P < 0,0001$ DC vs WC dan nilai *baseline*

Sumber : telah diolah kembali dari Grassi dkk¹³

Taubert, dkk melakukan penelitian *randomized, controlled, investigator-blinded, pararel-group* terhadap 44 subyek berusia 56-73 tahun dengan prahipertensi batas

atas dan hipertensi derajat 1 yang diberikan *dark chocolate* 6,3 g/hari (30 mg polifenol) dan *white chocolate* selama 18 minggu. Hasil penelitian memperlihatkan penurunan bermakna tekanan darah sistolik dan diastolik ($P < 0,001$). Penelitian ini juga menunjukkan peningkatan kadar S-nitrosoglutathione serum sebesar 0,23 (0,12) nmol/L ($P < 0,001$) yang dihasilkan dari reaksi gugus thiol dengan NO. Walau penelitian ini masih bersifat permulaan, hal ini menunjukkan peningkatan produksi NO sebagai mekanisme potensial dalam penurunan tekanan darah dengan mengonsumsi *dark chocolate*.¹⁴

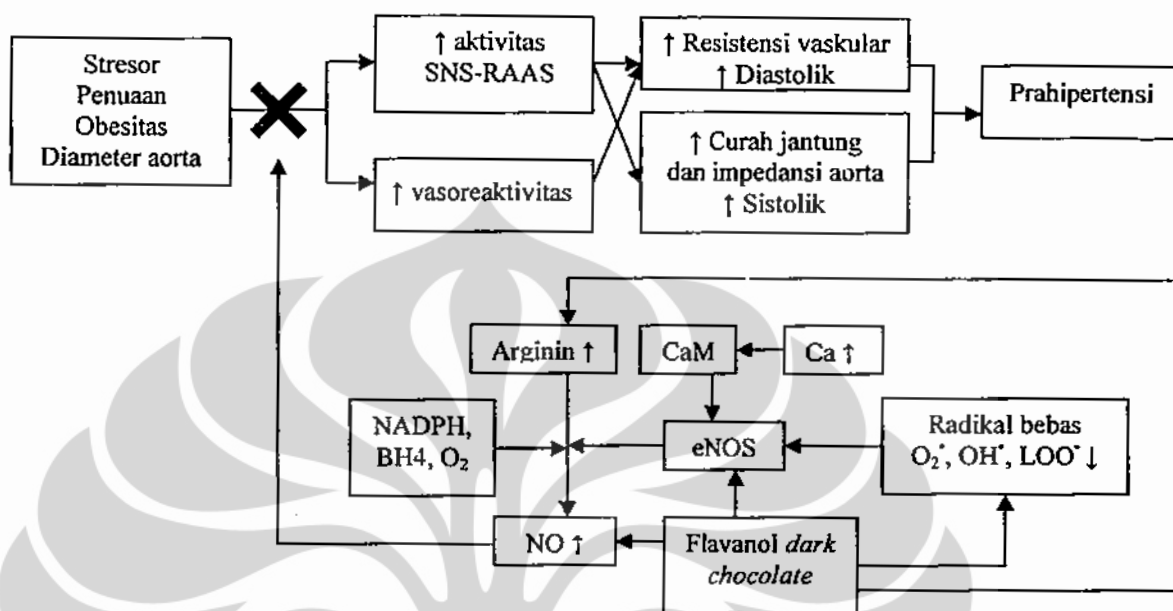
Grassi, dkk kembali melakukan penelitian terhadap 19 subyek hipertensi dengan toleransi glukosa terganggu dengan metode yang sama tetapi kandungan fenol yang tinggi (100 g *white chocolate* = 1008 mg total fenol = 110,9 epicatechin, 36,12 mg catechin) sedangkan *white chocolate* mengandung 0,13 g total fenol dan 0,04 mg catechin. Pemberian *dark chocolate* menurunkan tekanan darah sistolik dan diastolik secara bermakna ($P < 0,0001$).⁵¹

Faridi, dkk melakukan penelitian *randomized controlled crossover* terhadap 45 subyek dewasa sehat. Pada tahap 1, subyek dirandom untuk mendapatkan *dark chocolate* padat mengandung 22 g bubuk *cocoa*) atau plasebo yang tidak mengandung *cocoa* (0 g bubuk *cocoa*). Pada fase 2, subyek dirandom kembali untuk mendapatkan minuman *cocoa* tanpa gula (mengandung 22 g bubuk *cocoa*) atau minuman *cocoa* yang mengandung gula (mengandung 0 g bubuk *cocoa*). *Dark Chocolate* padat maupun minuman *cocoa* tanpa gula menunjukkan efek penurunan tekanan darah dibanding plasebo. Penurunan tekanan darah oleh *Dark Chocolate* : sistolik, $-3,2 \pm 5,8$ mm Hg, $P < 0,001$; dan diastolik, $-1,4 \pm 3,9$ mm Hg, $P < 0,01$; bubuk *cocoa* bebas gula : sistolik, $-2,1 \pm 7,0$ mm Hg, $P < 0,001$; dan diastolik: $-1,2 \pm 8,7$ mm Hg, $P < 0,014$.⁴⁴

Tabel 2.7. Ringkasan penelitian

Peneliti	Subyek	Intervensi	Kandungan polifenol	Sistolik	Diastolik
Grassi dkk (2005)	Sehat, rerata usia 33,9±7,6 tahun n = 15 orang	100 g <i>dark chocolate</i> vs. 90 g <i>white chocolate</i> selama 15 hari	500 mg total polifenol	107,5 ± 8,6	-
<i>Randomized, cross over trial</i>					
Grassi dkk (2005)	Hipertensi, rerata usia 43,65±7,8 tahun n = 20 orang	100 g <i>dark chocolate</i> vs. 90 g <i>white chocolate</i> selama 15 hari	88 mg/hari flavanols (22 mg catechin, 66 mg epicatechin)	-11,9 ± 7,7	-8,5 ± 5,0
<i>Randomized, cross over trial</i>					
Taubert dkk (2007)	Prehipertensi, Hipertensi derajat I rerata usia 63,4±4,8 tahun n = 44 orang	6,3 g <i>dark chocolate</i> vs <i>white chocolate</i>	30 mg polifenol	-2,9 ± 1,6	-1,9 ± 1,0
<i>Randomized, cross over trial</i>					
Grassi dkk (2008)	Hipertensi & IGT, rerata usia 44,8±8,0 tahun n = 19 orang	100 g <i>dark chocolate</i> vs. 90 g <i>white chocolate</i> selama 15 hari	1008 mg total fenol	-3,82 ± 2,4	-3,92 ± 1,98
<i>Randomized, cross over trial</i>					
Faridi dkk (2008)	Sehat, rerata usia 52,8±11,0 tahun n = 45 orang	74 g <i>dark chocolate</i> (22 g bubuk <i>cocoa</i>); 240 ml <i>cocoa</i> cair (bebas gula vs. regular)	821 mg total flavanols; 805,2 & 8,5 total flavanols	-3,2 ± 5,8	-1,4 ± 3,9
<i>Randomized, cross over trial</i>					

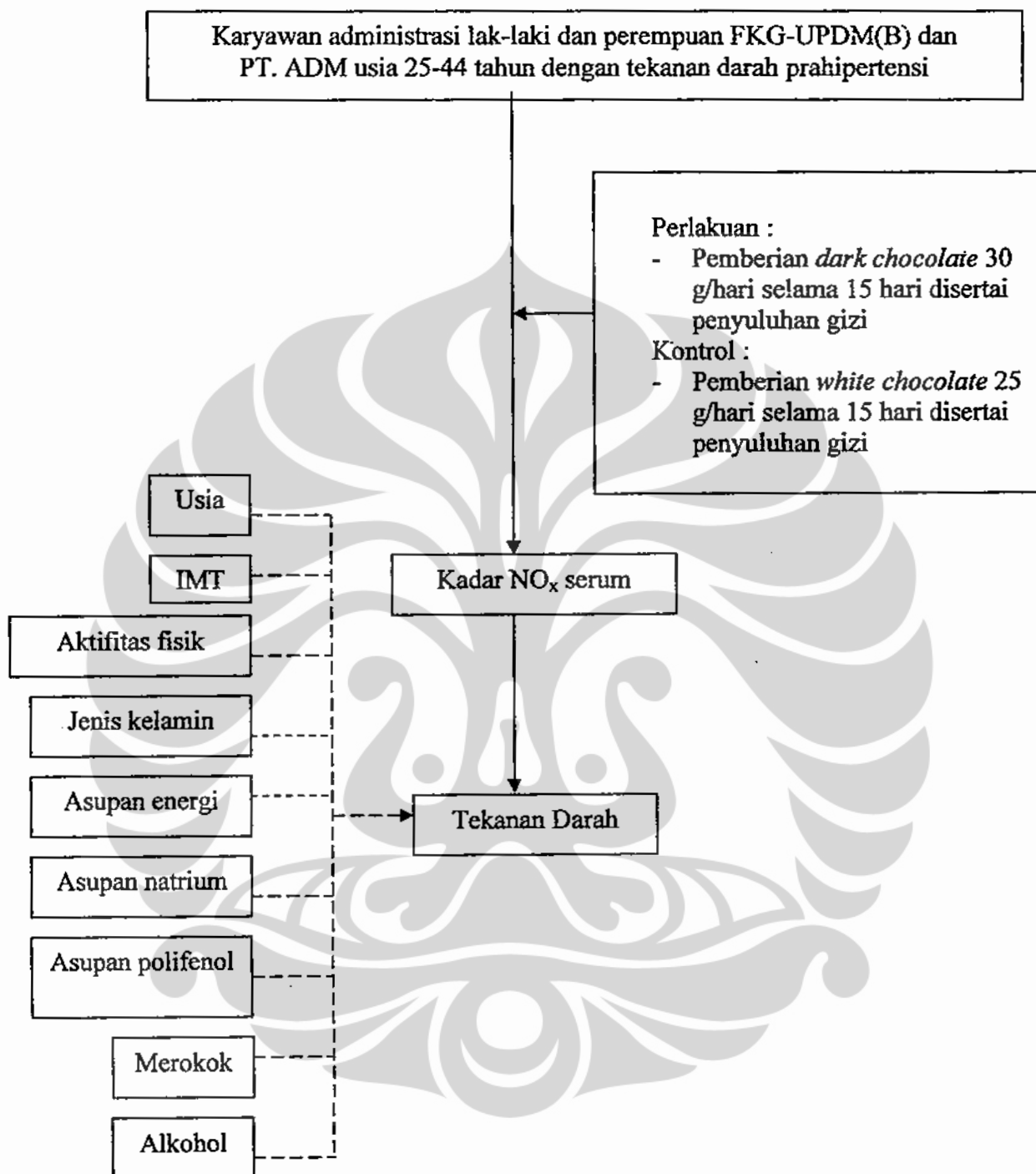
2.5. Kerangka Teori



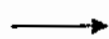
Keterangan

NO : Nitric Oxide; eNOS : endothelial Nitric Oxide Synthase; NADPH : Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate; CaM : Calmodulin; BH4 : Tetrahydrobiophtherine. SNS-RAAS : Sympathetic Nervous System-Renin-Angiotensin-Aldosterone System.

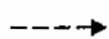
2.6. Kerangka Konsep



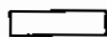
Keterangan :



: yang diteliti hubungannya



: yang tidak diteliti hubungannya



: yang diamati

BAB 3 METODA PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian uji klinis paralel, membandingkan kelompok yang mendapat *dark chocolate* disertai penyuluhan gizi (P) dengan kelompok yang mendapat *white chocolate* dan penyuluhan gizi (K).

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di FKG-UPDM(B) dan PT. ADM. Pengumpulan data dilakukan mulai bulan Maret sampai dengan April 2010. Penelitian berlangsung dari bulan Januari sampai dengan Mei 2010.

3.3. Bahan Penelitian

A. Populasi target

Populasi target adalah semua karyawan administrasi laki-laki dan perempuan usia 25-44 tahun dengan tekanan darah prahipertensi sesuai dengan klasifikasi JNC-7, yaitu tekanan darah sistolik antara 120-139 mm Hg dan atau tekanan darah diastolik antara 80-89 mm Hg.¹

B. Populasi terjangkau

Populasi terjangkau adalah semua karyawan administrasi laki-laki dan perempuan usia 25-44 tahun di FKG-UPDM(B) dan PT. ADM, Jakarta dengan tekanan darah prahipertensi pada bulan Maret 2010.

C. Subyek penelitian

Subyek penelitian adalah bagian dari populasi terjangkau yang memenuhi kriteria penelitian, dipilih secara *simple random sampling*, dan secara tertulis menyatakan bersedia ikut serta dalam penelitian. Alokasi subyek dilakukan dengan randomisasi blok.

Kriteria penerimaan :

- a. Laki-laki atau perempuan usia 25-44 tahun
- b. Tekanan darah prahipertensi (sistolik antara 120-139 mm Hg dan atau diastolik antara 80-89 mm Hg)¹

- c. IMT 18,5-24,9 kg/m²
- d. Secara tertulis bersedia mengikuti penelitian dan memenuhi prosedur yang telah ditentukan serta menandatangani formulir persetujuan.

Kriteria penolakan

- a. Memiliki riwayat penyakit hipertensi atau mengonsumsi obat antihipertensi yang diketahui dari anamnesis oleh peneliti.
- b. Kebiasaan merokok.⁴
- c. Mengonsumsi alkohol.⁴
- d. Mengonsumsi suplemen vitamin (C,E) atau antioksidan
- e. Mengonsumsi teh hijau
- f. Mengonsumsi *red wine*
- g. Hamil atau menyusui
- h. Menopause
- i. Gula darah puasa >126 mg/dL

Kriteria pengeluaran

- a. Subyek penelitian tidak teratur mengonsumsi *dark chocolate* dan *white chocolate* selama dua hari berturut-turut.
- b. Subyek penelitian mengonsumsi *dark chocolate* dan *white chocolate* <80% dari jumlah yang ditetapkan.
- c. Subyek penelitian menolak melanjutkan penelitian.
- d. Selama periode penelitian subyek menderita sakit yang memerlukan perawatan di rumah sakit.

D. Besar sampel

Besar sampel yang diperlukan untuk masing-masing kelompok dihitung berdasarkan rumus di bawah ini.⁵²

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

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

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

Z_β : deviasi relatif yang menggambarkan tingkat kekuatan uji statistik dalam menetapkan batas kemaknaan, ditetapkan 1,645 untuk $\beta = 0,05$

s : simpang baku selisih rerata

d : perbedaan klinis yang diharapkan (ditetapkan oleh peneliti)

Besar sampel berdasarkan kadar NOx serum :

Besar sampel berdasarkan kadar NOx serum belum dapat dihitung karena belum ada data yang pasti.

Besar sampel berdasarkan tekanan darah sistolik :

s : simpang baku penurunan tekanan darah sistolik yaitu 1,6 mm Hg.¹⁴

d : perbedaan penurunan tekanan darah sistolik yaitu 3,5 mm Hg.¹⁹

Maka besar sampel :

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

$$n_1 = n_2 = 5,431$$

Besar sampel berdasarkan tekanan darah diastolik :

s : simpang baku penurunan tekanan darah diastolik yaitu 1,5 mm Hg.¹⁴

d : perbedaan penurunan tekanan darah diastolik yaitu 2,1 mm Hg.¹⁹

Maka besar sampel :

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

$$n_1 = n_2 = 14$$

Perhitungan besar sampel berdasarkan tekanan darah diastolik lebih besar daripada tekanan darah sistolik, maka dipakai sebagai dasar pengambilan sampel yaitu 14 orang untuk masing-masing kelompok. Jika ditambah dengan perkiraan *drop-out* 10% maka besar sampel yang diperlukan adalah 16 orang untuk masing-masing kelompok.

E. Asupan makanan yang diberikan

Kelompok Perlakuan (P) dan Kontrol (K)

Pada seluruh subyek penelitian diberikan penyuluhan gizi berupa diet seimbang yang dihitung berdasarkan kebutuhan energi total dengan persamaan Harris-Benedict.⁵³

Komposisi makronutrien yang dianjurkan adalah karbohidrat 60%, lemak 25%, dan

protein 15% dari kebutuhan kalori total. Penyuluhan gizi dilakukan 3 kali yaitu H-8, H+1 dan H+8.

Kelompok P

Kelompok P mendapat *dark chocolate* 30 g/hari selama 15 hari berturut-turut (H+1-H+15). Dosis *dark chocolate* 30 g (174 mg polifenol; 86,4 mg flavanol; 152,7 kkal) sesuai dengan penelitian Grasi dkk¹³ yang memberikan 100 g *dark chocolate* (88 mg flavanol) selama 15 hari. Kandungan nutrisi dan polifenol dalam 30 g *dark chocolate* dan 25 g *white chocolate* dapat dilihat di Lampiran 13. Kandungan polifenol dan flavanol *dark chocolate* dapat dilihat di Lampiran 14.

Kelompok K

Kelompok P mendapat *white chocolate* 25 g/hari (kalori ~ 150 kkal) yang tidak mengandung polifenol selama 15 hari (H+1-H+15). Kandungan polifenol *white chocolate* dapat dilihat di Lampiran 15.

3.4. Instrumen Pengumpulan Data

A. Lampiran dan formulir

- Lampiran 1. : lembar persetujuan komite etik
- Lampiran 2. : lembar informasi penelitian
- Lampiran 3. : lembar persetujuan
- Lampiran 4. : lembar data karakteristik subyek
- Lampiran 5. : lembar seleksi dan riwayat penyakit
- Lampiran 6. : lembar catatan asupan makanan (*food record*)
- Lampiran 7. : lembar keluhan subyek
- Lampiran 8. : lembar hasil pemeriksaan klinis
- Lampiran 9. : lembar indeks aktivitas fisik
- Lampiran 10. : prosedur pemeriksaan laboratorium
- Lampiran 11. : prosedur randomisasi blok
- Lampiran 12. : contoh menu diet seimbang sehari
- Lampiran 13. : kandungan nutrisi *dark chocolate* dan *white chocolate*
- Lampiran 14. : kandungan polifenol dan flavanol *dark chocolate*
- Lampiran 15. : kandungan polifenol *white chocolate*

B. Peralatan

- *Dysposable syringe needle* 10 mL.
- *Torniquet* dan kapas alkohol 70%.
- Sentrifugator dan tabung sentrifugator.
- Micropipet 100 μ L.
- Timbangan berat badan *Seca* dengan ketelitian 0,1 kg.
- Alat ukur tinggi badan *microtoise stature meter* 2 m dengan ketelitian 0,1 cm
- *Food models*.
- Alat timbangan bahan makanan merk Braun dengan ketelitian 10 g.
- *Patient monitor* merk Bionet
- Stetoskop merk Littmann
- Sfigmomanometer air raksa dengan manset merk Riester

C. Spesimen

- Reagen kit pemeriksaan NOx *Colorimetric Cayman*.
- Darah vena kubiti sebanyak 10 mL.

3.5. Cara Kerja

A. Cara memperoleh subyek penelitian

Setelah mendapat persetujuan penelitian dari Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dan ijin penelitian dari FKG-UPDM(B) dan PT. ADM maka dilakukan penyebaran informasi penelitian kepada seluruh karyawan.

Karyawan yang bersedia berpartisipasi dalam penelitian diberikan lembar informasi dan dijelaskan mengenai tujuan penelitian, pemeriksaan yang akan dilakukan, serta manfaat penelitian. Karyawan yang menyatakan bersedia ikut serta diminta untuk mengisi dan menandatangani lembar persetujuan yang dikembalikan pada peneliti sebagai bukti turut serta dalam penelitian, kemudian dilakukan seleksi. Selanjutnya subyek penelitian dibagi menjadi dua kelompok yaitu kelompok perlakuan (P) dan kontrol (K) dengan cara randomisasi blok.

B. Pelaksanaan penelitian

Pelaksanaan penelitian dibagi dalam tiga periode yaitu periode pra perlakuan, perlakuan, dan pasca perlakuan

Periode pra perlakuan (H-20 sampai H0)

Pada H-20 dilakukan pemberian informasi dan penjelasan kepada subyek tentang maksud dan manfaat penelitian serta tahapan-tahapan yang dilakukan, termasuk periode *run-in* selama tujuh hari yang harus dilakukan.

Pada H-15 sampai dengan H-8 dilakukan wawancara untuk memperoleh subyek penelitian yang memenuhi kriteria penelitian dan memperoleh data karakteristik subyek. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan antropometri (meliputi BB dan TB) dan tekanan darah sistolik dan diastolik. Subyek yang memenuhi kriteria penelitian dibagi menjadi dua kelompok yaitu kelompok perlakuan (P) dan kelompok kontrol (K) dengan randomisasi blok (lampiran 11).

Pada H-7 subyek dari kedua kelompok memasuki masa *run-in* untuk standarisasi makanan dan gaya hidup. Kedua kelompok diberikan penyuluhan tentang anjuran diet seimbang dan lembar *food record* untuk mencatat makanan yang dikonsumsi selama masa *run-in*.

Pada H0, subyek menyerahkan data asupan makanan dengan metoda *food record*. Selanjutnya dilakukan pengukuran tekanan darah sistolik dan diastolik, pengambilan darah untuk pemeriksaan kadar NO_x serum, setelah malamnya berpuasa selama 10-12 jam. Hasil pemeriksaan dicatat dalam lampiran 10. Subyek diberikan penjelasan tentang konsumsi *dark chocolate* kepada kelompok P dan konsumsi *white chocolate* kepada kelompok K.

Periode perlakuan (H+1 sampai H+15)

Kelompok P dan K

Pada H+8 peneliti melakukan pemeriksaan tekanan darah sistolik dan diastolik, selanjutnya hasil dicatat dalam lampiran 8. *Food Record* yang berisi asupan energi, natrium, dan polifenol dikumpulkan dan selanjutnya diberikan penyuluhan gizi yang berisi diet seimbang. Subyek penelitian diberikan informasi tentang diet seimbang dengan bahasa sederhana dan memberikan kesempatan subyek untuk mengajukan pertanyaan selama penyuluhan tersebut. Pada akhir penyuluhan, subyek penelitian dimotivasi untuk menjalankan diet seimbang selama perlakuan dan jika ada

keterangan yang masih belum jelas atau keluhan selama menjalani diet seimbang, subyek diharapkan untuk langsung menanyakan kepada peneliti melalui telepon.

Kelompok P

Setiap pagi hari dan selama periode perlakuan, subyek penelitian mengonsumsi *dark chocolate* 30 g/hari yang telah disediakan di hadapan peneliti, dan ditanyakan mengenai keluhan atau gangguan yang dirasakan selama mengonsumsi *dark chocolate*, baik keluhan umum maupun gangguan pencernaan. Keluhan tersebut dicatat dalam Lampiran 7 dan ditanggapi agar subyek tidak mengalami gangguan kesehatan.

Kelompok K

Setiap pagi hari selama periode perlakuan, subyek penelitian mengonsumsi *white chocolate* 25 g/hari yang telah disediakan di hadapan peneliti, dan juga ditanyakan mengenai keluhan atau gangguan yang dirasakan selama mengonsumsi *white chocolate*, baik keluhan umum maupun gangguan pencernaan. Keluhan tersebut dicatat dalam Lampiran 7 dan ditanggapi agar subyek tidak mengalami gangguan kesehatan.

Periode pasca perlakuan (H+16)

Pada H+16, dilakukan pengumpulan data asupan energi, natrium, dan polifenol dengan metoda *food record*. Selanjutnya dilakukan pengambilan darah 10 mL untuk pemeriksaan kadar NO_x serum setelah malamnya berpuasa selama 10-12 jam dan pemeriksaan tekanan darah sistolik dan diastolik. Hasil pemeriksaan dicatat dalam lampiran 8.

C. Prosedur pengumpulan data

Wawancara

Pada saat seleksi, wawancara dilakukan dengan menggunakan kuesioner untuk mendapatkan data karakteristik subyek.

Pengukuran antropometri

Pengukuran antropometri dilakukan pada pra perlakuan (H₀), meliputi tinggi badan (TB), dan berat badan (BB). Setiap pengukuran dilakukan sebanyak dua kali dan data yang diambil adalah rata-rata dari hasil pengukuran tersebut. Hasil pengukuran digunakan untuk menentukan indeks massa tubuh (IMT).⁵⁴

Pengukuran TB

Menggunakan *microtoise stature 2 m* dengan ketelitian 0,1 cm yang digantungkan pada dinding setinggi dua meter dari lantai dengan satuan sentimeter tepat pada posisi nol. Pada waktu pengukuran, subyek tanpa alas kaki berdiri pada permukaan datar dan tumit rapat, kepala tegak menempel pada dinding sehingga pandangan tegak lurus dengan sumbu tubuh (*Frankfurt plane*). Bahu relaks, kedua lengan tergantung bebas di sisi tubuh, punggung, bokong, dan tumit menempel pada dinding. Kedua kaki lurus dan kedua lutut rapat. Papan *microtoise* diturunkan sampai menyentuh bagian paling atas kepala dan rambut tertekan. Pengukuran tinggi badan dilakukan saat subyek inspirasi maksimum.⁵⁴ Hasil pengukuran dicatat dalam lampiran 8.

Pengukuran BB

Menggunakan alat timbangan berat badan *Seca* dengan ketelitian 0,1 kg yang ditempatkan di tempat yang keras, permukaan yang rata dan jarum timbangan menunjukkan angka nol. Alat timbangan harus ditera lebih dahulu. Subyek ditimbang dalam keadaan kandung kencing kosong dan sebelum makan. Subyek berdiri di tengah permukaan timbangan dan melihat lurus ke depan, berdiri tegak tanpa dibantu, tenang, memakai baju seringan mungkin dan tanpa alas kaki atau kaus kaki.⁵⁴ Hasil pengukuran dicatat dalam lampiran 8.

Pengukuran tekanan darah

Pengukuran tekanan darah dilakukan oleh peneliti menggunakan *patient monitor* merk Bionet. Konsumsi sumber kafein, dan latihan fisik harus dihindari minimal 30 menit sebelum pemeriksaan. Subyek penelitian dalam posisi duduk tenang di kursi selama minimal lima menit, dengan kaki menapak pada lantai, dan lengan berada pada posisi setinggi jantung. Manset dipasang melingkar pada lengan sesuai dengan ukuran lengan subyek, dengan bagian bawah manset 2-3 cm di atas fossa kubiti dan bagian selang karet yang menekan tepat di atas arteri brakialis. Peneliti kemudian menekan tombol khusus untuk mengukur tekanan darah, *patient monitor* akan melakukan pembacaan tekanan darah secara otomatis, dan hasil dicatat. Pengukuran dilakukan sebanyak 2 kali dengan selang waktu 5 menit, kemudian diambil rata-ratanya. Pengukuran menggunakan stetoskop Littmann dan sfigmomanometer air raksa Riester dilakukan 5 menit berikutnya hanya untuk konfirmasi. Hasil pengukuran dicatat dalam lampiran 8.

Pemeriksaan laboratorium

Pada pagi hari setelah subyek penelitian berpuasa 10-12 jam semalam, dilakukan pengambilan sampel darah vena kubiti sebanyak 10 mL. Sampel darah ditampung dalam vacutainer, selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit untuk mendapatkan serum, dan serum disimpan dalam lemari pendingin. Pemeriksaan kadar NO_x serum menggunakan kit pemeriksaan *Colorimetri* Cayman dan menggunakan *Elisa reader* (lampiran 10).⁵⁵ Hasil pemeriksaan dicatat dalam lampiran 8.

Penilaian asupan makanan

Data asupan makanan diperoleh dengan metode *food record* melalui pencatatan dan dipertegas dengan wawancara.⁵⁴

Metoda *food record*

Subyek diminta mengumpulkan catatan makanan yang dikonsumsi selama 2x24 jam pada pra perlakuan, H+8 dan pasca perlakuan (satu kali pada hari kerja dan satu kali pada hari libur) dalam formulir catatan asupan makanan meliputi jenis dan jumlah makanan (langsung dicatat saat makan). Jumlah makanan diukur menggunakan ukuran standar seperti sendok, gelas, dan lain-lain.⁵⁴ Hasil dicatat dalam lampiran 6.

3.6. Identifikasi Variabel

A. Variabel bebas

- Pemberian *dark chocolate* 30 g
- Pemberian *white chocolate* 25 g
- Kadar NO_x serum

B. Variabel tergantung

- Kadar NO_x serum
- Tekanan darah sistolik
- Tekanan darah diastolik

3.7. Pengolahan, Analisis, Interpretasi, dan Penyajian Data

A. Pengolahan data

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

B. Analisis dan interpretasi data

Data dianalisis dengan menggunakan program *Statistical Package for Social Science* (SPSS versi 11.5). Analisis data asupan energi dan natrium menggunakan program *nutrisurvey* 2007.⁵⁴ Analisis asupan polifenol dilakukan secara manual menggunakan daftar kandungan polifenol dalam bahan makanan.⁸

Uji statistik yang akan digunakan adalah sebagai berikut :

- Untuk mengetahui data mempunyai sebaran normal atau tidak secara analitik digunakan uji Kolmogorov-Smirnov. Bila didapat nilai $p > 0,05$ maka data berdistribusi tidak normal atau sebaliknya.
- Bila data berdistribusi normal digunakan rerata dan simpang baku; sedangkan bila distribusi tidak normal digunakan nilai median dan minimum-maksimum
- Untuk menganalisis data perbedaan hasil perlakuan kedua kelompok maka bila kedua data berdistribusi normal digunakan uji t tidak berpasangan; atau bila salah satu atau kedua data berdistribusi tidak normal digunakan uji Mann-Whitney.
- Batas kemaknaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebesar 5% dengan ketentuan :

Bermakna : bila $p < 0,05$

Tidak bermakna : bila $p \geq 0,05$

C. Penyajian data

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

3.8. Batasan Operasional

1. Subyek penelitian

Subyek penelitian adalah karyawan administrasi laki-laki dan perempuan usia 25-44 tahun di FKG-UPDM(B) dan PT. ADM dengan tekanan darah prahipertensi serta memenuhi kriteria penelitian.

2. Usia

Usia ditentukan berdasarkan hari ulang tahun terakhir dan yang tertera di Kartu Tanda Penduduk.

3. Pendidikan

Pendidikan adalah tingkat pendidikan formal terakhir yang pernah diikuti subyek penelitian.

Rendah : tamat SLTP tapi tidak tamat SLTA

Sedang : tamat SLTA tapi tidak tamat perguruan tinggi atau akademi

Tinggi : tamat perguruan tinggi atau akademi

4. Status gizi

Kriteria status gizi ditentukan dengan perhitungan indeks massa tubuh (IMT). IMT adalah hasil pembagian berat badan (BB) dalam kilogram dengan tinggi badan (TB) kuadrat dalam meter (kg/m^2). Klasifikasi status gizi untuk orang dewasa berdasarkan kriteria Asia-Pasifik.

Tabel 3.1. Klasifikasi Status Gizi Dewasa Asia-Pasifik

Klasifikasi	IMT (kg/m^2)
Berat badan kurang	< 18,5
Berat badan normal	18,5-22,9
Berat badan lebih	≥ 23
Berisiko	23-24,9
Obes I	25-29,9
Obes II	≥ 30

Sumber : telah diolah kembali dari WHO-WPRO⁵⁹

5. Asupan energi,

Data asupan energi dan natrium dianalisis menggunakan program *nutrisurvey* 2007 dan daftar analisis bahan makanan.^{53,54} Analisis asupan polifenol dilakukan dengan menggunakan tabel daftar bahan makanan sumber polifenol.^{8,56}

A. Asupan energi

Asupan energi adalah besarnya jumlah kalori yang dikonsumsi per orang per hari dibandingkan dengan kebutuhan energi total (KET) per individu. KET adalah jumlah kebutuhan energi basal (KEB), aktivitas fisik (AF) dan efek termik makanan (ETM).

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

KEB dihitung dengan menggunakan rumus Harris-Benedict.⁵³

$$\begin{aligned} \text{KEB laki-laki (kkal/hari)} &= 66 + (13,7 \times \text{BB}) + (5 \times \text{TB}) - (6,8 \times \text{U}) \\ \text{KEB perempuan (kkal/hari)} &= 655 + (9,6 \times \text{BB}) + (1,8 \times \text{TB}) - (4,7 \times \text{U}) \end{aligned}$$

Keterangan :

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

Aktivitas fisik sehari-hari karyawan homogen (berdasarkan indeks aktivitas fisik (IAF), yaitu termasuk tingkat sedang), kemudian ditentukan penambahan kalori dengan menambahkan 10% dari KEB.⁵⁶ Penilaian asupan energi dapat dilihat pada tabel 3.2.

Tabel 3.2. Interpretasi Asupan Energi

Asupan Energi (kkal/hari)	Hasil Penilaian	Interpretasi
	<80% dari KET	Kurang
	80-120% dari KET	Cukup
	>120% dari KET	Lebih

Sumber: Waspadji⁵⁷

B. Asupan natrium

Asupan natrium adalah banyaknya natrium yang dikonsumsi dalam makanan per hari. Untuk menilai asupan natrium, rerata asupan natrium dibandingkan dengan anjuran asupan natrium menurut angka kecukupan gizi 2004 (AKG) yaitu 1500-2400 mg/hari (tabel III.4).

Tabel 3.3. Interpretasi Asupan Natrium

Asupan Natrium (mg/hari)	Hasil Penilaian	Interpretasi
	<1500	Kurang
	1500-2400	Cukup
	>2400	Lebih

Sumber : WNPG⁵⁸

C. Asupan polifenol

Asupan polifenol adalah banyaknya polifenol yang dikonsumsi dalam makanan per hari. Untuk menilai asupan polifenol, rerata asupan polifenol dibandingkan dengan anjuran asupan polifenol perhari yaitu 500-1000 mg.^{56,59}

6. Aktifitas fisik

Aktifitas fisik adalah semua kegiatan subyek yang dilakukan sehari-hari. Penilaian indeks aktivitas fisik dilakukan dengan wawancara menggunakan kuesioner indeks aktifitas fisik, dikelompokkan menurut nilai frekuensi (F), durasi (D) dan intensitas (I).

Indeks aktivitas fisik dihitung berdasarkan persamaan berikut :

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

Tabel 3.4. Interpretasi Indeks Aktifitas Fisik

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

Sumber : telah diolah kembali dari Montoye dkk⁶⁰

7. Penyuluhan gizi

Penyuluhan gizi adalah kegiatan untuk mengubah perilaku subyek penelitian agar mengikuti asupan diet seimbang yang dihitung berdasarkan kebutuhan energi total dengan persamaan Harris-Benedict. Komposisi makronutrien yang dianjurkan adalah karbohidrat 60%, lemak 25%, dan protein 15% dari kebutuhan kalori total.⁵³

8. *Dark chocolate*

Dark chocolate yang digunakan sebesar 30 g yang mengandung 70% *cocoa*, dengan kandungan 174 mg polifenol; 86,4 mg flavanol; 152,7 kkal.

9. *White chocolate*

White chocolate yang digunakan sebesar 25 g yang tidak mengandung *cocoa*, dengan kandungan 0 mg polifenol, flavanol 0 mg dan kalori sebesar 150 kkal.

10. NO_x serum

Kadar NO_x serum adalah kadar total nitrat dan nitrit serum yang diukur dengan menggunakan kit pemeriksaan *Colorimetric Cayman* dan pembacaan hasil dengan menggunakan *Elisa reader*.⁵⁵

Tabel 3.5. Interpretasi Kadar NO_x Serum

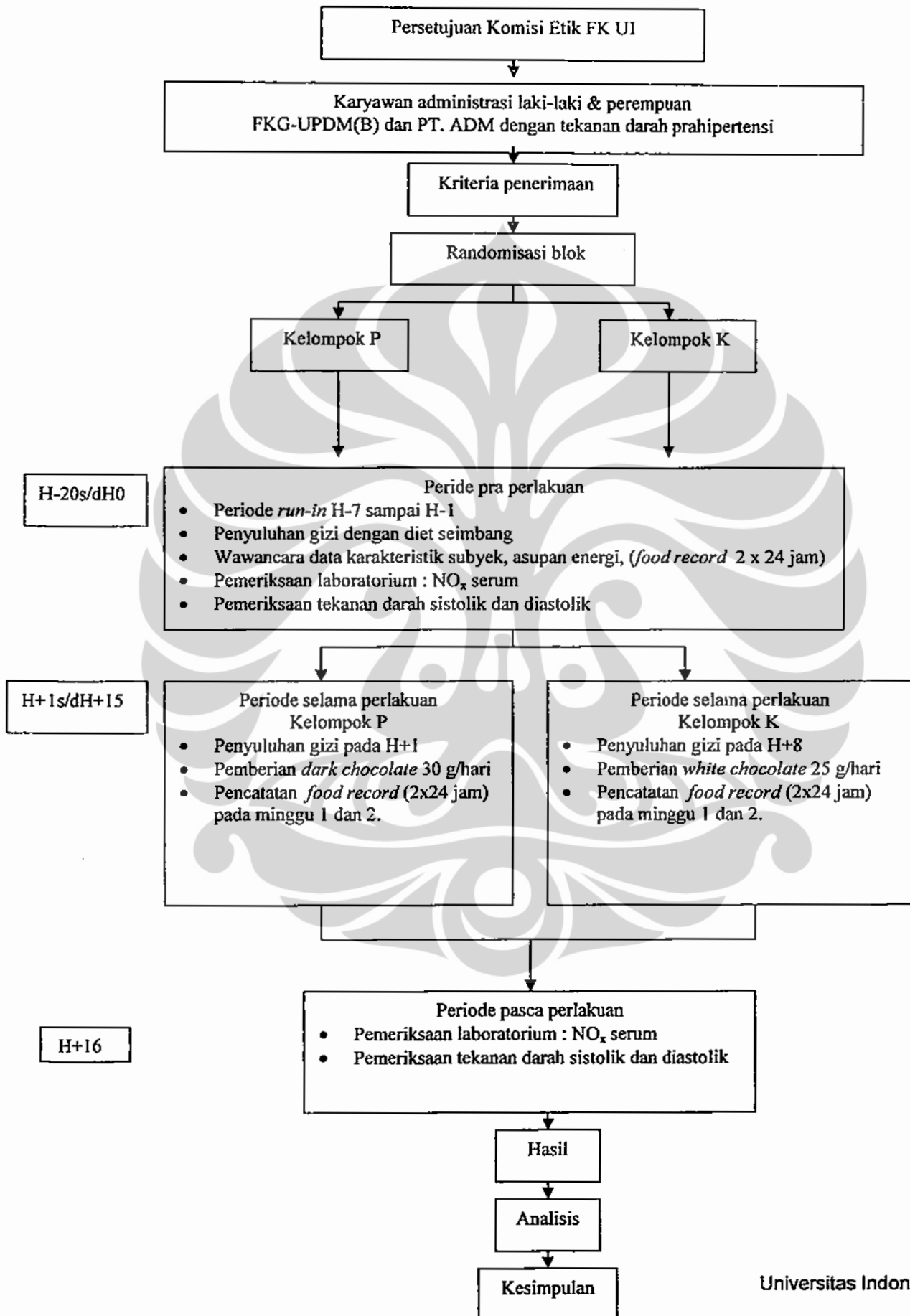
Kadar	Nilai Normal	Interpretasi
NO _x Serum	< 30	Rendah
(μ mol/L)	30,15-31	Normal
	> 31	Tinggi

Sumber : telah diolah kembali dari Roosevelt dkk⁶¹

11. Tekanan darah

Tekanan darah adalah nilai rerata hasil pengukuran tekanan darah sistolik dan diastolik subyek menggunakan *Patient Monitor* merk Bionet dan dikonfirmasi dengan stetoskop dan sfigmomanometer air raksa. Klasifikasi tekanan darah mengacu pada klasifikasi menurut JNC 7.

3.10. Kerangka Operasional



BAB 4

HASIL PENELITIAN

4.1. Seleksi Subyek Penelitian

Seleksi subyek penelitian dimulai pada minggu pertama Februari 2010, diawali dengan memberikan informasi penelitian kepada karyawan administrasi dan dosen FKG-UPDM(B) dan karyawan administrasi PT. ADM yang seluruhnya berjumlah 216 orang. Sebanyak 97 orang menyatakan bersedia ikut serta dalam penelitian, selanjutnya dilakukan pemilihan subyek penelitian berdasarkan kriteria penerimaan dan penolakan.

Berdasarkan kriteria penelitian, didapatkan 33 orang yang memenuhi kriteria dan sesuai dengan besar sampel yang diperlukan. Penentuan alokasi subyek penelitian dilakukan dengan cara randomisasi blok, didapatkan 16 orang subyek masuk ke dalam kelompok perlakuan dan 17 orang subyek sebagai kelompok kontrol. Seluruh subyek penelitian kemudian memasuki periode *run-in* selama 7 hari dan diberikan formulir *Food Record* untuk diisi, pada akhir periode *run-in* 1 orang dari kelompok kontrol mencapai tekanan darah normal sehingga dikeluarkan dari subyek penelitian. Total subyek penelitian sebesar 16 orang untuk masing-masing kelompok. Pada H0 dilakukan penilaian asupan energi, natrium, dan polifenol serta dilakukan pemeriksaan kadar NO_x serum, tekanan darah sistolik dan diastolik.

Periode perlakuan dimulai pada pertengahan minggu ketiga Maret 2010 selama lima belas hari berturut-turut dengan selang waktu 1 hari antara penelitian di FKG-UPDM(B) dengan penelitian di PT. ADM. Pada H+1 satu orang subyek kelompok perlakuan mengundurkan diri dengan alasan tidak mau diambil darah lagi, dan pada H+2 ada satu orang subyek kelompok perlakuan mengundurkan diri karena tidak mau mengonsumsi cokelat yang dirasanya pahit. Subyek kelompok perlakuan yang menyelesaikan penelitian adalah 14 orang, sedangkan subyek kelompok kontrol yang menyelesaikan penelitian sebanyak 16 orang. Total keseluruhan subyek kedua kelompok sebanyak 30 orang, yaitu 10 orang di FKG-UPDM(B) dan 20 orang di PT.

ADM. Hal ini tetap melebihi jumlah sampel minimal yang dibutuhkan yaitu 28 orang. Tingkat kehadiran subyek pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol mencapai 87%, sehingga keseluruhan subyek penelitian sudah memenuhi syarat minimal 80%. Penyuluhan gizi mengenai diet seimbang dilakukan sebanyak tiga kali sesuai dengan yang direncanakan yaitu pada H-8, H+1 dan H+8.

Pemeriksaan kadar NO_x serum serta pengukuran tekanan darah pasca perlakuan dilakukan pada 14 orang kelompok perlakuan dan 16 orang kelompok kontrol.

4.2. Karakteristik Subyek Penelitian

Subyek penelitian terdiri atas 20 orang (66,66%) laki-laki dan 10 orang (33,33%) perempuan. Sebanyak 16 orang subyek (53,33%) berusia 35-44 tahun dan 14 orang (46,67%) berusia 25-34 tahun. Dua orang (6,67%) subyek memiliki tingkat pendidikan rendah dan masing-masing 14 orang (46,67%) dengan tingkat pendidikan sedang dan tinggi.

Kelompok perlakuan memiliki indeks aktivitas lebih tinggi dibanding kelompok kontrol. Indeks Massa Tubuh normal ($\text{IMT } 18,5\text{-}22,9 \text{ kg/m}^2$) didapatkan pada 13 orang (43,33%), sedangkan 17 orang lainnya memiliki $\text{IMT } 23\text{-}24,9 \text{ kg/m}^2$.

Tabel 4.1 memperlihatkan sebaran subyek penelitian berdasarkan jenis kelamin, usia, tingkat pendidikan, aktivitas fisik, indeks massa tubuh, kadar NOx serum dan tekanan darah pra perlakuan.

Tabel 4.1. Sebaran Subyek Penelitian Berdasarkan Usia, Jenis Kelamin, Aktivitas Fisik, Indeks Massa Tubuh, Kadar NOx Serum dan Tekanan Darah Pra Perlakuan.

Variabel	Perlakuan	Kontrol	p
Jenis kelamin	1 (1-2) [#]	1 (1-2) [#]	0,619 ^m
Laki-laki	10 (71,43%)	10 (62,5%)	
Perempuan	4 (28,57%)	6 (37,5%)	
Usia (tahun)	36±7,42	33,44±6,08	0,304 ^{tt}
25-34 tahun	6 (42,86%)	8 (50%)	
35-44 tahun	8 (57,14%)	8 (50%)	
Tingkat pendidikan	2 (1-3) [#]	2,5 (1-3) [#]	0,710 ^m
Rendah	1 (7,14%)	1 (6,25%)	
Sedang	7 (50%)	7 (43,75)	
Tinggi	6 (42,8%)	8 (50%)	
Aktivitas Fisik	31,79±16,81	19,12±8,5	0,013 ^{tt}
Rendah	4 (28,57%)	8 (50%)	
Cukup	4 (28,57%)	8 (50%)	
Rata-rata	6 (42,86%)	-	
Indeks Massa Tubuh ((kg/m ²))	23,5 (17,10-24,9) [#]	23,6(17,22-24,3) [#]	0,559 ^m
Normal	6 (42,86%)	7 (43,75%)	
Overweight	8 (57,14%)	9 (56,25%)	
NOx serum ((μmol/L))	4,98±3,07	4,13(0,37-41,95) [#]	0,868 ^m
Tekanan Darah Sistolik (mm Hg)	128,64±5,89	128,12±7,72	0,837 ^{tt}
Tekanan Darah Diastolik (mm Hg)	80,5±6,3	77,75±5,40	0,215 ^{tt}

* = bermakna; tt = t-tes tidak berpasangan; m = mann whitney;
= median (minimum-maksimum)

Tidak didapatkan perbedaan bermakna pada variabel-variabel yang diteliti diantara kedua kelompok pada awal penelitian, kecuali pada aktifitas fisik. Hal ini menggambarkan kedua kelompok pada awal penelitian dalam keadaan cukup homogen.

4.3. Asupan Energi, Natrium, dan Polifenol Pra Perlakuan, H+8, Pasca Perlakuan Berdasarkan *Food Record* 2 x 24 Jam.

Tabel 4.2 memperlihatkan asupan energi, natrium, dan polifenol kedua kelompok pra perlakuan, H+8, dan pasca perlakuan yang diketahui dengan *food record* 2 x 24 jam.

Tabel 4.2. Rerata dan Simpang Baku Asupan Energi, Natrium, dan Polifenol Pra Perlakuan, H+8, dan Pasca Perlakuan Berdasarkan *Food Record* 2 x 24 Jam

Variabel	Perlakuan	Kontrol	p
Energi (kkal)			
Pra perlakuan	2111,57±238,25	2157,86±595,66	0,9 ^{tt}
Minggu 1	1511,86±66,25 ^a	1973,14±225,14	0,073 ^{tt}
Minggu 2	1759,14±232,36 ^a	2160,71±742,21	0,292 ^{tt}
Natrium (mg/hari)			
Pra perlakuan	2271,57±244,96	2152,14±256,59	0,391 ^{tt}
Minggu 1	2130,86±182,73 ^a	2110,57±230,62	0,858 ^{tt}
Minggu 2	2079,71±176,77 ^a	2010,29±185,99	0,488 ^{tt}
Polifenol (mg/hari)			
Pra perlakuan	128,86±73,32	136,14±86,25	0,868 ^{tt}
Minggu 1	316,43±70,46 ^a	141,43±88,14	0,002 ^{*tt}
Minggu 2	369,14±91,61 ^a	172,29±136,80	0,01 ^{*tt}

a = 14 orang subyek; * = bermakna; tt = t-tes tidak berpasangan

Tabel 4.3. Asupan Energi dan Persentase Asupan Energi Terhadap Kebutuhan Energi Total Individu

Variabel	Perlakuan	Kontrol	p
Energi (kkal)			
Pra perlakuan	2111,57±238,25	2157,86±595,66	0,9 ^{tt}
H+8	1511,86±66,2 ^a	1973,14±225,14	0,073 ^{tt}
Pasca perlakuan	1759,14±232,36 ^a	2160,71±742,21	0,292 ^{tt}
Persentase asupan (%) ^b	68,74±8,40	73,24±6,442	0,224 ^{tt}

a = 14 orang subyek; tt = t-tes tidak berpasangan;

b = persentase asupan energi dibandingkan dengan kebutuhan energi total

Asupan energi dan natrium antara kedua kelompok tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna pada pra perlakuan dan selama perlakuan. Asupan polifenol kelompok perlakuan lebih tinggi secara bermakna pada H+8 dan pasca perlakuan dibanding asupan polifenol kelompok kontrol.

4.4. Kadar NO_x Serum Pra dan Pasca Perlakuan

Tabel 4.3 memperlihatkan kadar NO_x serum Pra dan Pasca Perlakuan antara kedua kelompok.

Tabel 4.4. Kadar NO_x serum Pra dan Pasca Perlakuan Kelompok Perlakuan dan Kelompok Kontrol

Variabel	Perlakuan	Kontrol	p
NO _x serum (μmol/L)			
Pra perlakuan	4,98±3,07	4,13 (0,37-41,95) [#]	0,868 ^m
Pasca perlakuan	7,70±3,84 ^a	1,92 (-0,79-17,78) [#]	0,001 ^{*m}
Perubahan (Δ)	2,72±2,22	-2,36 (-24,17-0,14) [#]	0,000 ^{*m}
Nilai p	0,001 ^{*t}	0,001 ^{*w}	

a = subyek 14 orang ; * = bermakna ; m = mann whitney; w = wilcoxon; t = t-tes berpasangan

[#] = median (minimum-maksimum)

Kadar NO_x serum kelompok perlakuan mengalami peningkatan, sedangkan kadar serum NO_x pada kelompok kontrol menurun pasca perlakuan. Kadar NO_x serum antara pra dan pasca perlakuan meningkat bermakna pada kelompok perlakuan, demikian juga terdapat perbedaan signifikan kadar NO_x serum pasca perlakuan antara kedua kelompok.

4.5. Tekanan Darah Sistolik dan Diastolik

Tabel 4.4 menunjukkan rerata dan simpang baku tekanan darah pra, selama perlakuan dan pasca perlakuan.

Tabel 4.5. Rerata dan Simpang Baku Tekanan Darah pada Pra perlakuan, H+8 dan Pasca Perlakuan

Variabel	Perlakuan	Kontrol	p
Sistolik (mm Hg)			
Pra perlakuan	128,64±5,89	128,12±7,72	0,837 ^{tt}
H+8	122,71±10,36 ^a	126,44±8,02	0,287 ^{tt}
Pasca perlakuan	120,64±8,47 ^a	131,19±7,45	0,001 ^{*tt}
Perubahan	-8,00±5,67	-3,06±4,39	0,000 ^{*tt}
Nilai p	0,000 ^{*t}	0,432 ^t	
Diastolik (mm Hg)			
Pra perlakuan	80,5±6,3	77,75±5,40	0,215 ^{tt}
H+8	74,07±8,38 ^a	76,19±8,85	0,507 ^{tt}
Pasca perlakuan	74,14±6,30 ^a	77,44±10,29	0,308 ^{tt}
Perubahan	-6,36±6,15	-0,31±7,24	0,021 ^{*tt}
Nilai p	0,009 ^{*t}	0,283 ^t	

a = subyek 14 orang; * = bermakna; t = t-tes berpasangan; tt = t-tes tidak berpasangan ;

Tekanan darah sistolik dan diastolik pada H+8 dan pasca perlakuan menurun pada kedua kelompok. Terdapat penurunan bermakna tekanan darah sistolik dan diastolik kelompok P antara pra dan pasca perlakuan. Pada kelompok K tidak terjadi

penurunan bermakna tekanan darah sistolik dan diastolik antara pra dan pasca perlakuan. Tekanan darah sistolik pada akhir penelitian berbeda bermakna antara kedua kelompok, sedangkan tekanan darah diastolik tidak berbeda bermakna.

4.6. Korelasi Antara Perubahan Kadar NOx Serum dan Tekanan Darah Sistolik dan Diastolik

Perubahan kadar NOx serum pada pra dan pasca perlakuan dianalisis korelasinya dengan tekanan darah sistolik dan diastolik. Uji korelasi dilakukan dengan uji korelasi Rank-Spearman karena data tidak berdistribusi normal. Tabel 4.5 menunjukkan korelasi antara perubahan kadar NOx serum dengan perubahan tekanan darah.

Tabel 4.6. Korelasi Antara Perubahan Kadar NOx serum dengan Tekanan Darah

	Δ NOx serum	
	r^s	p
Δ Tekanan darah sistolik	-0,640	0,000*
Δ Tekanan darah diastolik	-0,377	0,04*

* = bermakna ; r = koefisiensi korelasi dengan uji korelasi Rank Spearman

^s = koefisien korelasi r :

- 0 – 0,25 : tidak ada hubungan-korelasi lemah
- 0,26 – 0,50 : korelasi cukup
- 0,51 – 0,75 : korelasi kuat
- 0,76 – 1,00 : korelasi kuat sekali

Terdapat korelasi negatif kuat bermakna antara perubahan kadar NOx serum dengan perubahan tekanan darah sistolik dan korelasi negatif cukup kuat bermakna terhadap tekanan darah diastolik.

BAB 5

PEMBAHASAN

Telah dilakukan penelitian dengan desain uji klinis paralel, membandingkan kelompok P yang mendapat *dark chocolate* 30 g/hari selama lima belas hari berturut-turut disertai penyuluhan gizi dengan kelompok K yang mendapat *white chocolate* 25 g/hari disertai penyuluhan gizi di FKG-UPDM(B) dan PT. ADM. Dari 32 subyek penelitian, hanya 30 subyek yang terdiri atas 14 subyek pada kelompok perlakuan dan 16 subyek pada kelompok kontrol yang mengikuti penelitian hingga selesai.

5.1. Keterbatasan Penelitian

5.1.1 Metoda Penelitian

Pada penelitian ini tidak dilakukan *blind* walaupun peneliti berusaha melakukan *blind* dengan memasukkan sediaan cokelat dalam kotak kecil yang sama bentuk dan warnanya. Sulitnya *blinding* dalam penelitian *dark chocolate* juga dialami penelitian lain, seperti penelitian Grassi dkk⁵¹

5.1.2 Penilaian Asupan Zat Gizi

Penilaian asupan zat gizi dilakukan dengan metoda *food record*, dalam pelaksanaannya subyek penelitian cenderung tidak mencatat secara langsung makanan yang dikonsumsi. Subyek umumnya mencatat makanan yang dikonsumsi pada malam hari atau keesokan harinya, hal ini menyebabkan hasil perhitungan asupan makanan mungkin menjadi bias.

Analisis asupan natrium sulit dilakukan karena umumnya subyek membeli makanan jadi sehingga tidak diketahui jumlah garam yang digunakan, dan penambahan garam dalam masakan yang dihidangkan tidak dapat dipastikan secara akurat.

Zat aktif dalam *dark chocolate* adalah flavanol, tetapi saat ini belum ada metode untuk menganalisis flavanol dalam bahan makanan sumber sehingga penelitian ini menganalisis asupan polifenol secara manual menggunakan rujukan yang mencantumkan daftar bahan makanan sumber polifenol.^{8,56} Peneliti mengalami kesulitan untuk beberapa makanan lokal yang tidak tercantum dalam daftar makanan sumber polifenol seperti gado-gado, ketoprak, lontong sayur dan beberapa makanan

lainnya. Dalam hal ini analisis polifenol dilakukan dengan memperkirakan jumlah dari masing-masing komposisi makanan, namun hal ini dapat mempengaruhi hasil perhitungan jumlah asupan makanan subyek menjadi *underestimate* atau bahkan *overestimate*.

5.1.3 Pemeriksaan Laboratorium

Metode pengukuran kadar NO yang sering digunakan adalah kadar *circulating plasma nitros(yl)ated species* (RXNOs), yang merupakan marker diagnostik penting untuk menilai bioavailabilitas NO dan fungsi endotel. RXNOs juga merupakan marker diagnostik untuk melihat perubahan jangka panjang aktivitas eNOS.⁶² Taubert dkk memeriksa kadar *S-nitrosothiols* yang merupakan reaksi NO tidak stabil dengan gugus thiol untuk melihat pengaruh *cocoa* terhadap NO dan tekanan darah.¹⁴ Atas dasar keterbatasan teknis, antara lain *kit* pemeriksaan yang harganya mahal dan tidak biasanya teknisi laboratorium untuk melakukan pemeriksaan-pemeriksaan tersebut maka pemeriksaan dengan metode di atas tidak dapat dilakukan.

Pada penelitian ini NO diukur dengan kadar NO_x serum menggunakan metoda *Colorimetric Griess merk Cayman*. Kadar NO_x serum yang diukur adalah total kadar nitrat dan nitrit serum yang relatif stabil. Tetapi kadar NO_x serum belum terbukti secara ilmiah dapat memberikan gambaran produksi dan aktivitas NO.⁶³

5.2. Seleksi Subyek Penelitian

Sebanyak 97 orang karyawan laki-laki dan perempuan FKG-UPDM(B) dan PT. ADM menyatakan bersedia mengikuti penelitian dengan menandatangani lembar persetujuan penelitian.

Kriteria penerimaan adalah subyek laki-laki dan perempuan berusia 25-44 tahun. Sebanyak 12 orang tidak memenuhi batasan usia yang telah ditentukan karena berusia lebih dari 44 tahun. Enam orang tidak termasuk kriteria tekanan darah prahipertensi (sistolik antara 120-139 mm Hg dan atau diastolik antara 80-89 mm Hg), dua orang (2,06%) memiliki tekanan darah normal, sedangkan empat orang (4,12%) memiliki tekanan darah hipertensi derajat 1.

Pemilihan subyek dengan IMT 18,5-24,9 kg/m², yang berdasarkan klasifikasi status gizi dewasa Asia Pasifik termasuk kategori normal sampai *overweight*.⁵⁹ Sebanyak sembilan orang yang tidak memenuhi kriteria penerimaan yaitu enam

orang (6,18%) memiliki IMT $>24,9 \text{ kg/m}^2$, tiga orang (3,09%) memiliki IMT kurang dari normal. Subyek dengan IMT *obese* tidak dimasukkan sebagai subyek penelitian karena peningkatan IMT berhubungan dengan peningkatan tekanan darah.⁶⁵ IMT $>25 \text{ kg/m}^2$ ($26-28 \text{ kg/m}^2$) meningkatkan risiko tekanan darah tinggi hingga 180% jika dibandingkan dengan BMI $<23 \text{ kg/m}^2$. Mekanisme peningkatan tekanan darah pada obesitas masih belum dipahami, namun peningkatan BMI berhubungan dengan peningkatan volume plasma dan curah jantung.⁶⁵

Berdasarkan kriteria penolakan, diketahui melalui anamnesa 3 orang (3,09%) mengonsumsi obat antihipertensi secara teratur dan 1 orang (1,03%) mengonsumsi obat antihipertensi secara tidak teratur. Tiga puluh tiga orang (34%) memiliki kebiasaan merokok sehingga tidak dapat memenuhi kriteria subyek penelitian. Walaupun hubungan langsung antara merokok dan hipertensi masih belum jelas, merokok menyebabkan aktivasi simpatis, stres oksidatif, dan efek vasopresor akut yang berhubungan dengan peningkatan penanda inflamasi. Hal ini berhubungan erat dengan hipertensi. Kebiasaan merokok juga dapat menyebabkan disfungsi endotel, trauma vaskular, pembentukan plak dan peningkatan kekakuan arteri yang menyebabkan terjadinya hipertensi.⁶⁶

Subyek peminum alkohol tidak termasuk dalam subyek penelitian, karena alkohol dapat mempengaruhi tekanan darah walaupun mekanismenya belum jelas. Alkohol diduga dapat merangsang hipotalamus untuk mensekresi hormon kortisol dan kortikotropin yang berperan meningkatkan aktivitas sistem saraf simpatis. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa pengurangan konsumsi alkohol dapat menurunkan tekanan darah sistolik dan diastolik.⁶⁷

5.3. Karakteristik Subyek Penelitian

Tidak didapatkan perbedaan yang bermakna pada karakteristik subyek penelitian (tabel 4.1), hal tersebut menggambarkan kedua kelompok dalam keadaan homogen. Namun, didapatkan perbedaan bermakna karakteristik aktivitas fisik, dimana rerata aktivitas fisik kelompok P termasuk kategori cukup sedangkan kelompok K termasuk kategori rendah. Karakteristik kedua kelompok homogen merupakan salah satu syarat dalam uji klinis untuk mendapatkan hasil yang sah. Salah satu cara yang

digunakan dalam penelitian ini adalah dengan melakukan randomisasi blok, walaupun terdapat perbedaan pada aktivitas fisik.

5.3.1. Jenis Kelamin

Dari 30 subyek penelitian terdapat 20 orang (66,67%) subyek laki-laki dan 10 orang (33,33%). Hal ini sesuai dengan rujukan yang menyatakan bahwa prahipertensi lebih sering dijumpai pada laki-laki, hal ini disebabkan pembentukan hormon aldosteron dari progesteron yang berperan meningkatkan absorpsi natrium dari ginjal.⁴

5.3.2 Usia

Kelompok usia 35-44 tahun lebih banyak (53,33%) dibanding kelompok usia 25-34 tahun (46,67%). Hal ini sesuai dengan SKRT tahun 2004 yang menunjukkan peningkatan tekanan darah dengan bertambahnya usia.²

Usia merupakan salah satu faktor risiko peningkatan tekanan darah, data SKRT 2004 juga memperlihatkan tekanan darah meningkat sejalan dengan bertambahnya usia. Bertambahnya usia secara fisiologis menyebabkan perubahan elastisitas struktur dinding pembuluh darah sehingga menyebabkan peningkatan resistensi perifer.¹

5.3.3 Tingkat pendidikan

Tingkat pendidikan subyek pada penelitian ini tidak berbeda bermakna antara kedua kelompok. Tingkat pendidikan terbanyak terdapat pada kategori sedang, hal tersebut berpengaruh terhadap kebiasaan makan coklat dan derajat kepatuhan subyek. Dari dua orang subyek yang mengundurkan diri, satu orang memiliki tingkat pendidikan rendah dan satu orang memiliki tingkat pendidikan sedang.

5.3.4. Indeks Massa Tubuh (IMT)

IMT kedua kelompok pra perlakuan tidak berbeda bermakna, sebagian besar subyek memiliki IMT dalam kategori *overweight* (56,67%), sedangkan sisanya (43,33%) termasuk dalam IMT kategori normal. Indeks massa tubuh tinggi merupakan salah satu faktor risiko peningkatan tekanan darah. Risiko terjadinya peningkatan tekanan darah pada orang yang mempunyai berat badan lebih adalah dua sampai enam kali lebih tinggi daripada orang dengan berat badan normal. Kelebihan berat badan $\geq 20\%$ dari berat badan ideal, meningkatkan risiko prahipertensi dua kali daripada non *obese*.⁴

Mekanisme kenaikan tekanan darah pada subyek dengan IMT berlebih diduga karena hipervolemia dan peningkatan curah jantung tanpa pengurangan tahanan perifer yang sesuai, juga adanya peningkatan aktivitas sistem saraf simpatis dan resistensi insulin.⁶⁷

5.3.5. Aktivitas Fisik

Rerata aktivitas fisik kelompok P termasuk kategori cukup sedangkan kelompok K termasuk kategori rendah. Hal ini sesuai dengan penelitian Hu dkk yang menyatakan bahwa aktivitas fisik yang kurang berisiko mengalami peningkatan tekanan darah.⁶⁸

Aktivitas fisik yang rendah, dapat menurunkan produksi NO yang secara paralel menurunkan produksi *Endothelial Derived Relaxing Factors* (EDRF) sehingga menyebabkan peningkatan tekanan darah.⁴ Aktivitas fisik dinilai berdasarkan indeks aktivitas fisik meliputi jenis olahraga, frekuensi, intensitas, dan durasi. Rendahnya indeks aktivitas subyek penelitian berkaitan erat dengan aktivitas karyawan yang cenderung lebih banyak duduk.

5.4. Asupan Energi, Natrium dan Polifenol Pra Perlakuan dan Selama Perlakuan Berdasarkan *Food Record* 2x24 Jam

Penilaian asupan nutrisi memperlihatkan nilai rerata asupan energi, natrium, dan polifenol berdasarkan *Food Record* 2x24 jam pada pra perlakuan, H+8 dan pasca perlakuan pada kedua kelompok tidak berbeda bermakna.

5.4.1. Asupan Energi

Asupan energi pada kedua kelompok tidak berbeda bermakna. Rerata asupan energi masih di bawah AKG Indonesia tahun 2004 (2500 kkal)⁵⁸ namun bila dilihat dari persentase asupan energi dibandingkan dengan kebutuhan energi total masing-masing subyek, maka asupan tersebut tergolong dalam kategori cukup (80-120% kebutuhan energi total) baik untuk kelompok perlakuan maupun kelompok kontrol. Asupan energi yang sama disebabkan karena baik kelompok perlakuan yang mendapat *dark chocolate* maupun kelompok kontrol yang mendapat *white chocolate* mendapat tambahan kalori yang sama yaitu ± 150 kkal/hari. Kebutuhan energi juga berhubungan dengan rendahnya indeks aktivitas fisik sehari-hari, subyek lebih banyak melakukan kegiatan statis yang sedikit memerlukan energi.

5.4.2. Asupan Natrium

Asupan natrium yang berlebihan cenderung meningkatkan volume plasma yang menyebabkan terjadinya hipertensi.⁶⁹ Asupan natrium meliputi penggunaan garam dan bahan makanan sumber natrium lainnya, seperti kecap asin dalam makanan sehari-hari serta kebiasaan mengkonsumsi makanan ringan dan makanan yang diasinkan.

Tidak didapatkan perbedaan yang bermakna asupan natrium pada pra perlakuan, minggu 1 dan 2 pada kedua kelompok. Rerata asupan natrium kedua kelompok sedikit lebih rendah dibandingkan dengan AKG Indonesia 2004 (1500-2400 mg/hari).⁵⁸ Rendahnya rerata asupan natrium mungkin disebabkan keterbatasan analisis asupan natrium sehingga memperlihatkan hasil yang *underestimate*, hal tersebut juga juga dilaporkan Kawano dkk.⁷⁰ *The Working Group for Dietary Salt Reduction of the Japanese Society of Hypertension* merekomendasikan penilaian asupan natrium individual dalam tatalaksana hipertensi menggunakan pengukuran ekskresi natrium dari sampel urin 24 jam.⁷⁰

Membatasi asupan natrium sesuai angka kecukupan gizi diketahui bermanfaat mengurangi risiko peningkatan tekanan darah. Asupan natrium tersebut mempengaruhi kemampuan ginjal mengekskresikan natrium, sehingga dapat mengakibatkan terjadinya penurunan kadar natrium dan air dalam darah. Perubahan ini mengakibatkan terjadinya penurunan volume plasma dan curah jantung yang berperan dalam menurunkan tekanan darah. Natrium juga berperan mempengaruhi reaktivitas pembuluh darah terhadap hormon norepinefrin dan transpor aktif ion Na^+ melalui membran sel otot polos pembuluh darah sehingga berperan merangsang atau menghambat kontraksi pembuluh darah.^{4,19}

5.4.3. Asupan Polifenol

Tidak terdapat perbedaan yang bermakna asupan polifenol pra perlakuan pada kedua kelompok. Berdasarkan *food record* 2x24 jam, asupan polifenol pada kedua kelompok dibawah anjuran yaitu 500-1000 mg/hari.⁵⁹

Pada H+8 dan pasca perlakuan terdapat peningkatan bermakna asupan polifenol pada kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol. Perbedaan asupan polifenol antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol diduga akibat penambahan polifenol sebesar 174 mg yang terkandung dalam *dark chocolate* 30

g/hari yang diberikan kepada kelompok perlakuan. Asupan polifenol kedua kelompok tidak dibatasi kecuali asupan *wine* dan teh hijau karena kedua minuman ini kaya akan kandungan polifenol.⁵⁶

5.5. Kadar NO_x Serum Pra dan Pasca Perlakuan

Kadar NO_x serum pra dan pasca perlakuan cenderung rendah. Hal ini sesuai dengan penelitian Fortuño dkk yang menemukan bahwa kadar NO_x serum pada subyek dengan hipertensi cenderung rendah dibanding dengan normotensi.⁷¹ Pada hipertensi, substrat arginin untuk sintesis NO mulai berkurang akibat bertambah beratnya disfungsi endotel.⁷²

Terdapat perbedaan bermakna kadar NO_x serum pasca perlakuan ($p=0,001$) antara kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Pada kelompok perlakuan didapatkan peningkatan kadar NO_x serum yang bermakna ($p=0,001$), sedangkan pada kelompok kontrol didapatkan hasil penurunan bermakna kadar NO_x serum ($p=0,001$). Pemberian *dark chocolate* yang memberikan tambahan asupan polifenol merupakan salah satu penyebab terjadinya peningkatan kadar NO_x serum pada kelompok perlakuan. Fisher dkk menyatakan bahwa polifenol meningkatkan regulasi transkripsi eNOS sehingga akan terjadi peningkatan bioaktivitas NO.⁷³ Heiss dkk juga menemukan bahwa flavanol di cokelat memiliki kemampuan untuk meningkatkan bioaktivitas NO.⁷⁴

5.6. Tekanan Darah Sistolik dan Diastolik

Terjadi penurunan tekanan darah sistolik dan diastolik pada kedua kelompok. Hal ini mungkin disebabkan pemberian penyuluhan gizi yang dilakukan kepada kedua kelompok. Izzo dkk menyatakan penyuluhan gizi yang baik dapat membantu menurunkan tekanan darah.³

Terjadi penurunan tekanan darah pra dan pasca perlakuan pada kelompok P yang bermakna secara statistik, sedangkan kelompok K tidak bermakna. Penurunan tekanan darah mungkin disebabkan kandungan polifenol di dalam *dark chocolate* seperti yang dinyatakan Ghosh dkk bahwa polifenol dalam cokelat memiliki efek vaskular yang dapat menurunkan tekanan darah.⁷⁵

Pasca perlakuan tekanan darah sistolik menurun bermakna ($p=0,001$), sedangkan tekanan darah diastolik menurun tetapi tidak berbeda bermakna ($p=308$). Hasil tersebut berbeda dengan hasil penelitian oleh Grassi dkk pada subyek hipertensi yang diberikan 100g/hari *dark chocolate* (88 mg flavanol) selama 15 hari yang menunjukkan penurunan tekanan darah sistolik dan diastolik yang bermakna dibanding subyek yang mendapat *white chocolate* 90 g/hari.¹³

Perbedaan hasil penelitian ini mungkin disebabkan karena subyek pada penelitian ini adalah subyek prahipertensi, sedangkan subyek pada penelitian Grassi dkk adalah subyek penderita hipertensi. Sebagai perbandingan penelitian Grassi dkk yang dilakukan pada subyek dengan tekanan darah normal hanya menunjukkan penurunan yang bermakna pada tekanan darah sistolik.⁴⁵ Penelitian lain yang juga tidak menunjukkan efek penurunan tekanan darah yang signifikan pada subyek normotensif yang diberikan cocoa atau *dark chocolate* antara lain dilakukan oleh Fraga dkk dan Vlachopoulos dkk.^{47,76}

Alat yang digunakan untuk mengukur tekanan darah pada penelitian Grassi dkk adalah *Ambulatory Blood Pressure Monitoring* (ABPM) yang lebih akurat dan sensitif dibanding alat *patient monitor* ataupun sfigmomanometer yang digunakan pada penelitian ini. Dosis *dark chocolate* yang diberikan pada penelitian ini lebih rendah dari dosis yang diberikan pada penelitian Grassi dkk walaupun kandungan zat aktifnya sama. Perbedaan dosis tersebut akan mempengaruhi kandungan zat aktif lain yang terkandung dalam cokelat, seperti magnesium dan *theobromine*. Dalam dosis 100 g *dark chocolate* menyuplai kurang lebih 120% DRI magnesium. Magnesium merupakan mineral yang penting dalam regulasi tekanan darah. Berdasarkan penelitian, asupan magnesium dari makanan berhubungan terbalik dengan tekanan darah dibandingkan asupan dari suplemen.¹² Demikian juga kandungan *Theobromine* yang lebih kecil akan mempengaruhi penurunan tekanan darah karena *Theobromine* memiliki kemampuan untuk merelaksasi otot polos jaringan dan mendilatasi pembuluh darah.⁷⁷ Perbedaan hasil tersebut mungkin juga dipengaruhi oleh durasi yang pendek, perbedaan produk cokelat yang diberikan, perbedaan demografi dan status kesehatan subyek dan faktor-faktor lainnya.⁴⁶

Pada penelitian ini dilihat juga pengaruh asupan energi, natrium, dan polifenol terhadap perubahan tekanan darah. Persentase asupan energi kedua

kelompok terhadap kebutuhan energi total dalam penelitian ini tergolong kategori cukup dan tidak didapatkan perbedaan yang bermakna, dapat diperkirakan karenanya asupan energi tidak mempengaruhi perubahan tekanan darah.

Asupan natrium selama perlakuan pada kedua kelompok tidak memperlihatkan perbedaan yang bermakna dan lebih rendah dibandingkan AKG Indonesia 2004. Hasil penilaian asupan natrium tidak menggambarkan keadaan yang sebenarnya karena keterbatasan metode penilaian dan analisis asupan natrium. Karenanya dapat diperkirakan asupan natrium tidak mempengaruhi perubahan tekanan darah.

Asupan polifenol juga diketahui berperan mempengaruhi tekanan darah melalui peningkatan kadar NO sebagai vasodilator. Asupan polifenol yang lebih tinggi pada kelompok perlakuan menyebabkan kadar NO_x serum pada kelompok perlakuan lebih tinggi secara signifikan dibandingkan kelompok kontrol. Namun hal ini tidak cukup untuk memberikan perbedaan penurunan tekanan darah diastolik yang bermakna antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

5.7. Korelasi Antara Perubahan Kadar NO_x Serum dengan Tekanan Darah

Perubahan kadar NO_x serum berkorelasi negatif kuat bermakna terhadap tekanan darah sistolik dan berkorelasi negatif cukup kuat bermakna dengan tekanan darah diastolik. Hal ini sesuai dengan penelitian Hall dkk yang menyatakan bahwa pada peningkatan kadar NO_x serum maka akan terjadi peningkatan vasodilatasi endotel yang menyebabkan penurunan tekanan darah.⁷⁸

BAB 6

RINGKASAN, KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Ringkasan

Prahipertensi adalah keadaan yang ditandai tekanan darah sistolik antara 120-139 mm Hg dan atau tekanan darah diastolik antara 80-89 mm Hg.¹ Rerata tekanan darah kelompok usia 25-34 tahun adalah 124,7/79,9 mm Hg kemudian meningkat dengan bertambahnya usia.² Prevalensi prahipertensi lebih banyak ditemukan pada laki-laki (40%) dibandingkan perempuan (23%).⁴

Gangguan vaskular pada penderita prahipertensi disebabkan penurunan pembentukan dan bioavailabilitas *nitric oxide* (NO) yang menyebabkan terjadinya disfungsi endotel.⁵ *Nitric Oxide* adalah vasodilator yang dihasilkan oleh endotelium yang berfungsi menjaga tonus vaskular.⁷ Berkurangnya sekresi NO salah satunya disebabkan karena berkurangnya sintesis NO endogen dari arginin. Polifenol memiliki kemampuan mengaktivasi *endothelial Nitric Oxide Synthase* (eNOS) yang akan meningkatkan sintesis dan bioavailabilitas NO sehingga akan memperbaiki fungsi endotel.¹⁰

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh *dark chocolate* terhadap kadar NO_x serum dan tekanan darah. Penelitian ini merupakan uji klinis paralel, membandingkan kelompok yang mendapat *dark chocolate* 30 g/hari selama lima belas hari berturut-turut disertai penyuluhan gizi (P) dengan kelompok yang hanya mendapat *white chocolate* 25 g/hari dan penyuluhan gizi saja (K) pada karyawan administrasi laki-laki dan perempuan FKG-UPDM(B) dan PT. ADM dengan tekanan darah prahipertensi.

Sebanyak 97 orang menyatakan bersedia untuk ikut serta dalam penelitian, dan menandatangani lembar persetujuan penelitian. Berdasarkan kriteria penelitian, didapatkan sejumlah 32 orang karyawan yang memenuhi kriteria sebagai subyek penelitian. Penentuan alokasi subyek penelitian dilakukan dengan cara randomisasi blok, dan didapatkan 16 orang subyek sebagai kelompok P dan 16 orang subyek sebagai kelompok K. Dalam perjalanannya, hanya 30 orang yang berhasil menyelesaikan penelitian ini.

Data diperoleh dari hasil wawancara meliputi usia, indeks aktivitas fisik, asupan energi, natrium, dan polifenol berdasarkan *food record* 2x24 jam. Selain itu juga dilakukan pengukuran berat badan, tinggi badan, dan penilaian indeks massa tubuh. Pemeriksaan kadar NO_x serum dilakukan pra dan pasca perlakuan, sedangkan pengukuran tekanan darah sistolik dan diastolik dilakukan pra perlakuan, H+8 dan pasca perlakuan (H+16).

Subyek penelitian ialah karyawan laki-laki dan perempuan yang berusia 25-44 tahun; 46,67% subyek berusia 25-34 tahun, sedangkan 53,3% sisanya berusia 35-44 tahun. Indeks aktivitas fisik subyek yang termasuk kategori rata-rata sebanyak 6 orang (20%), kategori cukup sebanyak 12 orang (40%), dan kategori rendah sebanyak 12 orang (40%). Pada awal penelitian karakteristik data dasar pada kedua kelompok tidak memperlihatkan perbedaan yang bermakna, kecuali pada karakteristik aktivitas fisik.

Rerata asupan gizi kedua kelompok masih di bawah AKG Indonesia tahun 2004 (2500 kkal) namun persentase asupan energi dibandingkan dengan kebutuhan energi total masing-masing subyek tergolong dalam kategori cukup (80-120% kebutuhan energi total) baik untuk kelompok perlakuan maupun kelompok kontrol. Rerata asupan natrium kedua kelompok pada pra perlakuan, H+8 dan pasca perlakuan sedikit lebih rendah dibandingkan dengan AKG Indonesia 2004 (1500-2400 mg/hari). Dua orang kelompok K mengeluh pada awal minggu ke 2 mengeluh agak pusing setelah mengonsumsi *white chocolate*

Terdapat perbedaan bermakna pada asupan polifenol pada H+8 dan pasca perlakuan antara kelompok P dan kelompok K. Perbedaan yang bermakna sesuai dengan tambahan 174 mg polifenol dalam *dark chocolate* pada kelompok P.

Pasca perlakuan didapatkan perbedaan yang bermakna pada kadar NO_x serum pasca perlakuan antara kelompok P dengan kelompok K ($p=0,001$). Kadar NO_x serum pada kelompok P antara pra dan pasca perlakuan meningkat bermakna ($p=0,001$), sedangkan kelompok K menurun bermakna ($p=0,001$). Tekanan darah pada kedua kelompok mengalami penurunan. Tekanan darah sistolik pasca perlakuan berbeda bermakna antara kelompok P dan kelompok K ($p=0,001$), sedangkan tekanan darah diastolik menurun tidak bermakna ($p=0,308$). Tekanan darah sistolik dan diastolik pra dan pasca perlakuan kelompok P menurun bermakna ($p=0,000$),

sedangkan tekanan darah sistolik dan diastolik pra dan pasca perlakuan pada kelompok K menurun tidak bermakna.

Terdapat korelasi negatif kuat bermakna antara perubahan kadar NO_x serum dengan perubahan tekanan darah sistolik dan korelasi negatif cukup kuat bermakna terhadap perubahan tekanan darah diastolik.

6.2. Kesimpulan

Pada penelitian pengaruh *dark chocolate* terhadap kadar NO_x serum dan tekanan darah pada karyawan laki-laki dan perempuan, dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut :

1. Subyek yang berusia 35-44 tahun lebih banyak dibandingkan dengan subyek yang berusia 25-34 tahun dengan indeks aktivitas fisik subyek dibawah nilai rata-rata.
2. Persentase asupan energi terhadap kebutuhan energi total pada kedua kelompok tergolong kategori cukup, sedangkan asupan natrium pada kedua kelompok selama perlakuan sedikit lebih rendah dibandingkan dengan AKG Indonesia 2004. Selama perlakuan didapatkan asupan polifenol pada kelompok P lebih tinggi bermakna dibanding kelompok K.
3. Terdapat peningkatan bermakna kadar NO_x serum pada kelompok P dan perbedaan bermakna kadar NO_x serum antara kelompok P dan kelompok K.
4. Terdapat penurunan bermakna tekanan darah sistolik sedangkan tekanan darah diastolik menurun tidak bermakna antara kelompok P dengan kelompok K.

Berdasarkan hal tersebut di atas, hipotesis yang dapat dibuktikan pada penelitian adalah pengaruh pemberian *dark chocolate* terhadap peningkatan kadar NO_x serum dan penurunan tekanan darah sistolik, sedangkan pengaruh terhadap penurunan tekanan darah diastolik belum dapat dibuktikan.

6.3. Saran

1. *Dark chocolate* yang mengandung 70% *cocoa* dengan dosis 10-30 g/hari dapat disarankan kepada penderita prahipertensi usia 25-44 tahun sebagai terapi tambahan untuk menurunkan tekanan darah.

2. Penilaian asupan natrium harus dilakukan dengan metode pemeriksaan yang lebih tepat, yaitu pemeriksaan kadar Na dalam urin 24 jam.
3. Perlu dilakukan penelitian dengan rancangan uji klinik acak tersamar ganda pada pasien hipertensi, menggunakan metoda pengukuran NO yang lebih tepat untuk meneliti pengaruh *dark chocolate* sebagai terapi tambahan untuk penderita hipertensi.



SUMMARY, CONCLUSIONS, AND RECOMMENDATIONS

Summary

Prehypertension is condition defined as a systolic blood pressure between 120-139 mm Hg and or diastolic blood pressure between 80-89 mm Hg.¹ The mean of blood pressure in Indonesia at 25-34 years old are 124,7/79,9 mm Hg and will rise parallel with aging process.² Prehypertension prevalence in men (40%) are higher than in women (23%)⁴

Vascular disorders in prehypertension patients was influenced by decreases in synthesis and bioavailability of *nitric oxide* (NO) leading to endothelial dysfunction.⁵ *Nitric Oxide* is a vasodilator product of endothelium to maintain vascular tone.⁷ One of the cause that decreases secretion of NO is the decrease of endogenous NO synthesis from arginin. Polyphenol activate *endothelial Nitric Oxide Synthase* (eNOS) which will increase synthesis and bioavailability of NO that in turn will restore endothelial function.¹⁰

The aims of this study were to investigate dark chocolate effects on serum NO_x level and blood pressure. This was a parallel randomized clinical trial comparing subjects who received dark chocolate at 30 g/day for 15 days and nutritional counseling (T) with subjects received white chocolate 25 g/day for 15 days and nutrition counseling (C) in male and female employee with prehypertension in Dental Faculty Prof. Dr. Moestopo (Beragama) University and Andalan Darma Mulia Company.

Ninety seven employee provided written informed consent to participate in the present study. Thirty two subjects were selected using certain criteria. The subjects were divided into two groups using block randomized, sixteen subjects in the treatment group and others in the control group. Only thirty subjects completed the study.

Data collected in this study consist of age, physical activity, body massa index, intake of energy, sodium, and polyphenol, NO_x serum levels and blood pressure. Laboratory finding of NO_x serum level were done in pre- and after treatment phase, while systolic and diastolic blood pressure examination was done in pre, during and after treatment phase.

The age of the subjects were between 25-44 year old; who 46,67% were 25-34 years old, and 53,3% were 35-44 years old. Physical activities index in average level was found in 6 subjects (20%), sufficient level in 12 subjects (40%) and low level in 12 subjects (40%). The data characteristic of two groups at base line were no significant difference, except in physical activity. The characteristic of the two groups were closely matched at base line.

Mean intake of energy in both groups were lower than Indonesian Recommended Dietary Allowance 2004 however the percentage of actual energy intake compared with total individual energy requirement in both groups were considered adequate (80-120% total energy requirement). The average intake of sodium in both groups were lower than Indonesian Recommended Dietary Allowance 2004 (1500-2400 mg/day). Two (6,67%) subjects in control group complained dizziness early in second week after consuming white chocolate. Polyphenol intake in first and second week between treatment and control groups were significantly different, that seemed to be caused by addition of 174 mg polyphenol in dark chocolate.

After 15 days treatment, NO_x serum level between treatment and control groups was significantly different ($p=0,001$). Pre and after treatment, NO_x serum in treatment group was higher ($p=0,001$), while it was lower in control group ($p=0,001$). Both groups had decreased systolic and diastolic blood pressure. Systolic blood pressure was decreased significantly between groups after treatment ($p=0,001$), while diastolic blood pressure was not significant ($p=0,308$). There was significant strong negative correlation between the change of NO_x serum level and the change of systolic blood pressure, while there was significant moderate negative correlation for the change of diastolic blood pressure.

Conclusions

The effect of dark chocolate on NO_x serum level and blood pressure in male and female employee were concluded that :

1. The number of the subjects with the age ranged between 35-44 years old were higher compared with the subjects range 25-34 years old.

2. Percentage of actual energy intake compared with total individual energy requirement in both groups were in adequate level, while natrium intake in both groups throughout treatment period were lower compared with Indonesian Recommended Dietary Allowance 2004 (1500-2400 mg/day). In treatment period polyphenol intake in treatment group were higher than control group.
3. There was significantly increase in NO_x serum level in treatment group and significantly different in NO_x serum level between treatment and control groups.
4. There was significantly decrease in systolic blood pressure while no significant difference in diastolic blood pressure.

Therefore, the hypothesis that was proven in this study was the effect of dark chocolate on NO_x serum level and systolic blood pressure, while the effect on diastolic blood pressure has not been proven.

Recommendations

1. Dark chocolate 10-30 g/day which contain 70% cocoa should be recommended to prehypertension patient aged 25-44 years old as adjuvant therapy to reduce blood pressure .
2. Assessment of sodium intake should be conduct with more suitable method, which is assessment of sodium level in 24 hours urine.
3. Further study is recommended with double blind randomized controlled trial to hypertensive patient using more suitable NO assessment to assess effect of dark chocolate on NO and blood pressure as adjuvant therapy.

DAFTAR REFERENSI

1. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: The JNC 7 Report. *JAMA* 2003; 289:2560-72.
2. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan Republik Indonesia. *Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT)* 2004. Volume 2. Jakarta: Litbangkes.
3. *Morbidity & Mortality: 2009 Chart Book on Cardiovascular, Lung & Blood Disease*. Oktober 2009.
4. Izzo JL. Prehypertension: Demographics, Pathophysiology, and Treatment. *Current Hypertension Report*. 2007;9:264-8.
5. Couch SC, Krummel DA. Medical Nutrition Therapy for Hypertension. In: Mahan LK, Escott-Stump S, editors. *Krause's Food and Nutrition Therapy*. 12th ed. Missouri: Saunder Elsevier. 2008. p.865-83.
6. Foëx P. Hypertension: Pathophysiology and Treatment. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*. 2004;4(3):71-5.
7. Drexler H. Review: Nitric Oxide and Coronary Dysfunction in Humans. *Cardiovascular research*. 1999;43:572-9.
8. Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PLM. Nitrite and Nitrate Determination in Plasma: A Critical Evaluation. *Clin Chem*. 1995;41(6):892-6.
9. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C dan Jimenez L. Polyphenols: Food Sources and Bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004;79:727-47.
10. Erdman JW, Carson L, Uribe C, Evans EM dan Allen RR. Effect of Cocoa Flavanols on Risk Factors for Cardiovascular Disease. *Asia Pac J Clin Nutr* 2008;17(S1):284-7.
11. Engler MB, Engler MM, Chen CY, Malloy MJ, Browne A, Chiu EY et al. Flavonoid-rich Dark Chocolate Improves Endothelial Function and Increase Plasma Epicatechin Concentration in Healthy Adults. *J Am Coll Nutr* 2004; 23(3):197-204.
12. Engler MB. The Emerging Role of Flavonoid-rich Cocoa and Chocolate in Cardiovascular Health and Disease. Business Briefing : US Cardiology 2004. dari http://www.touchcardiology.com/files/article_pdfs/5217.pdf diakses tanggal 18 November 2009.

13. Grassi D, Necozione S, Lippi C, Groce G, Valeri L, Pasqualetti P et al. Cocoa Reduces Blood Pressure and Insulin Resistance and Improves Endothelium-dependent Vasodilatation in Hypertensive. *Hypertension* 2005;46:398-405.
14. Taubert D, Roesen R, Lehmann C, Jung N dan Schomig E. Effects of Low Habitual Cocoa Intake on Blood Pressure and Bioactive Nitric Oxide. *JAMA* 2007;298:49-60.
15. Jalil A dan Ismail A. Poliphenol in Cocoa and Cocoa Products: is There a Link Between Antioxidant Properties and Health? *Molecules* 2008;13:2190-219.
16. Suryohudoyo P. Dasar Molekuler Patogenesis Hipertensi. Dalam: *Kapita Selekta Ilmu Kedokteran Molekuler*. Jakarta: Sagung Seto. 2000.hal.66-79.
17. Sherwood L. The Blood Vessels and Blood Pressure. In: *Human Physiology*. 6th ed. Thomson Brooks. 2007. p.373-5.
18. Chia YC. Prehypertension: What is the Current Status? *Malaysian Family Physician*. 2008;3(2):72-6.
19. Svetkey LP. Management of Prehypertension. *Hypertension*. 2005;45:1056-61.
20. Gerasimovska-Kitanovska B, Zafirovska K, Bogdanovska S, Lozance L, Severova-Andreevska G. Decrease Nitric Oxide in Women With Essential Hypertension in Prehypertension Stage. *Croat Med J*. 2005;46(6):889-93.
21. Gilani M, Kaiser DR, Bratteli CW, Alinder C, Rajala S, Bank AJ et al. Role of Nitric Oxide Deficiency and its Detection as a Risk Factor in Prehypertension. *Journal of the American Society of Hypertension*. 2007;1(1):45-55.
22. Cooke JP, Dzau VJ. Nitric Oxide Synthase: Role in the Genesis of Vascular Disease. *Annu Rev Med*. 1997;48:489-509.
23. Smith C, Marks AD, Lieberman M. Oxygen Toxicity and Free Radical Injury. In: *Marks' Basic Medical Biochemistry. A Clinical Approaches*. 2nd ed. Lippincot Williams & Wilkins. 2005. p.445-7.
24. Keen CL, Holt RR, Oteiza PI, Fraga CCG, Schmitz HH. Cocoa Antioxidants and Cardiovascular Health. *Am J Clin Nutr* 2005;81(suppl):298S-303S.
25. Murray RK. Muscle and the Cytoskeleton. In: *Murray RK, Granner DK, Rodwell VW, editors. Harper's Illustrated Biochemistry*. 27th ed. Boston: McGraw Hill. 2003. p.580-2.
26. Tsuchiya K, Takiguchi Y, Okamoto M, Izawa Y, Kanematsu Y, Yoshizumi M, et al. Malfunction of Vascular Control in Lifestyle-Related Disease : Formation of Systemic Hemoglobin-Nitric Oxide Complex (HbNO) From Dietary Nitrite. *J Pharmacol Sci* 2004; 96:395-400.

27. Lundberg JO, Weitzberg E. NO Generation From Nitrite and Its Role in Vascular Control. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:915-22.
28. Andersen J, Shafi NI, Bryan RM. Endothelial Influences on Cerebrovascular Tone. *J Appl Physiol.* 2006;100:318-27.
29. Carretero Oa, Oparil S. Essential Hypertension. *Circulation* 2000;101:329-35.
30. Keen CL. Chocolate: Food as Medicine/Medicine as Food. *Journal of the American College of Nutrition* 2001;20(5):436S-9S.
31. Shroeter H, Heiss C, Balzer J, Kleinbongard P, Keen CL, Hollenberg NK et al. (-)-Epicatechin Mediates Beneficial Effects of Flavanol-rich Cocoa on Vascular Function in Humans. *PNAS* 2006;103(4):1024-9.
32. Cai H, Harrison DG. Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Disease : The Role of Oxidant Stress. *Circ Res* 2000; 87:840-4.
33. Kelishadi R. Cacao to Cocoa to Chocolate: Healthy Food ? *Arya journal* 2005;1(1):29-35.
34. Ashton J, Asthon S. It's All in a Box of Chocolates. In: *A Chocolate a Day: Keep the Doctor Away*. New York, NY: Thomas Dunne Books/St. martin's Press;2003:9-24.
35. EO Afoakwa. Cocoa and Chocolate Consumption – Are There Aphrodisiac and Other Benefits for Human Health? *S Afr J Clin Nutr* 2008;21(3):107-13.
36. Keen CI, Holt RR, Oteiza PI, Fraga CG, Schmitz HH. Cocoa Antioxidants and Cardiovascular Health. *Am J Clin Nutr* 2005;81(suppl):298S-303S.
37. Rios LY, Gonthier M, Remesy C, Mila I, Lapiere, Lazarus SA et al. Chocolate Intake Increases Urinary Excretion of Polyphenol-derived Phenolic Acids in Healthy Human Subjects. *Am J Clin Nutr* 2003;77:912-8.
38. Ding EL, Hurlfless SM, Ding X, Girotra S. Chocolate and Prevention of Cardiovascular Disease: A Systematic Review. *Nutrition & metabolism* 2006;3:1-13.
39. Uribe C, Bektash RM. Cocoa Flavanols: Measurement, Bioavailability and Bioactivity. *Asia Pac J Clin Nutr* 2008;17:280-3.
40. Hooper L, Kroon PA, Rimm EB, Cohn JS, Harvey I, Cornu KA et al. Flavonoids, Flavonoid-rich Foods, and Cardiovascular Risk: a Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Am J Clin Nutr* 2008;88:38-50.
41. Williamson G, Manach C. Bioavailability and Bioefficacy of Polyphenols in Human. II. Review of 93 Intervention studies. *Am J Clin Nutr* 2005;81(suppl):243S-55S.
42. Engler MB, Engler MM. The Vasculoprotective Effects of Flavonoid-rich Cocoa and Chocolate. *Nutrition Research* 2004;24:695-706.

43. Rios LY, Bennett RN, Lazarus SA, Remesy C, Scalbert A, Williamson G. Cocoa Procyanidins are Stable During Gastric Transit in Humans. *Am J Clin Nutr* 2002;76:1106-10.
44. Faridi Z, Njike VY, Dutta S, Ali A, Katz DL. Acute Dark Chocolate and Cocoa Ingestion and Endothelial Function: a Randomized Controlled Crossover Trial. *Am J Clin Nutr* 2008;88:58-63.
45. Fraga CG. Cocoa, Diabetes, and Hypertension: Should We Eat More Chocolate? *Am J Clin Nutr* 2005;81:541-2.
46. Rimbach G, Melchin M, Moehring J, Wagner AE. Polyphenols From Cocoa and Vascular Health – A Critical Review. *Int. J. Mol. Sci* 2009;10:4290-309.
47. Flammer AJ, Hermann F, Sudano I, Spieker L, Hermann M, Cooper KA et al. Dark Chocolate Improves Coronary Vasomotion and Reduces Platelet Reactivity. *Circulation* 2007;116:2376-82.
48. Buijsse B, Feskens EJM, Kok FJ, Kromhout D. Cocoa Intake, Blood Pressure and Cardiovascular Mortality. The Zutphen Elderly Study. *Arch Intern Med.* 2006;166:411-7.
49. Gu L, House S, Wu X, Ou B, Prior RL. Procyanidin and Catechin Contents and Antioxidant Capacity of Cocoa and Chocolate Products. *J Agric Food Chem* 2006;54:4057-61.
50. Grassi D, Lippi C, Necozione S, Desideri G, Ferri C. Short-term Administration of Dark Chocolate is Followed by a Significant Increase in Insulin Sensitivity and a Decrease in Blood Pressure in Healthy Person. *Am J Clin Nutr* 2005;81:611-4.
51. Grassi D, Desideri G, Necozione S, Lippi C, Casale R, Properzi G et al. Blood Pressure is Reduced and Insulin Sensitivity Increased in Glucose-Intolerant, Hypertensive Subjects After 15 Days of Consuming High-Polyphenol Dark Chocolate. *J Nutr* 2008;138:1671-6.
52. Madiyono B, Moeslichan S, Sastroasmoro S, Budiman I, Purwanto HS. Perkiraan Besar Sampel. Dalam: Sastroasmoro S, dan Ismael S, editor. *Dasar-Dasar Metodologi Penelitian Klinis*. Edisi ke-2. Jakarta: Sagung Seto. 2002.hal. 269
53. Butte NF, Caballero B. Energy Needs: Assessment and Requirements. In: Shils ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, editors. *Modern Nutrition In Health and Disease*. 10th edition. Philadelphia: Lippicott Williams & Wilkins. 2006.p.136-48.
54. Gibson RS. *Principles of Nutritional Assessment*. 2nd edition. New York: Oxford University Press. 2005.p.273-93.

55. Nims RW, Darbyshire JF, Saavedra JE. Colorimetric Method For The Determination of Nitric Oxide Concentration In Neutral Aqueous Solutions. *Method* 1995;7:48-54.
56. Prez-Jiménez J, Neveu V, Vos F, Augustin Scalbert. Systematic Analysis of the Content of 502 Polyphenols in 452 Foods and Beverages: An Application of the Phenol-Explorer Database. *J. Agric. Food Chem* 2010;58(8):4959-69.
57. Waspadji S, Semiardji G, Sukardji K, Moenarko R. *Cara Mudah Mengatur Makanan Sehari-Hari Seimbang dan Sesuai Kebutuhan Gizi*. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. 2007.hal.1-25
58. Widyakarya Nasional Pangan dan Gizi 2004. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. *Angka Kecukupan Gizi Indonesia (Rata-Rata Per Orang Per Hari)*. 2004.
59. Williamson G, Holst B. Dietary reference intake (DRI) value for dietary polyphenols: are we heading in the right direction? *British Journal of Nutrition* 2008;99:Suppl3:S55-8.
60. Montoye HJ, Kemper HCG, Saris WHM, Washburn RA. Measuring Physical Activity and Energy Expenditure. *Human Kinetic*. 1996.
61. Roosevelt FD. The Chemistry of Free Radicals and Related Reactive Species. In: Halliwell B, Gutteridge JMC, editors. *Free Radicals In Biology and Medicine*. 4th edition. New York: Oxford University Press. 2007.p.30-78.
62. Heiss C, Lauer T, Dejam A, Kleinbongard P, Hamada S, Rassaf T, Matern S, Feilisch M dkk. Plasma Nitroso Compounds are Decreases in Patients with Endothelial Dysfunction. *Journal of the American College Cardiology* 2006;47:3:573-9.
63. Tarpey MM, Fridovich I. Method of Detection of Vascular Reactive Species : Nitric Oxide, Superoxide, Hydrogen Peroxide, and Peroxynitrite. *Circ Res*. 2001;89:224-36.
64. WHO-WPRO. The Asia-Pacific Perspective : Redefining Obesity and Its Treatment. *Health Communications Australia*, 2000.p.22. Dalam <http://www.diabetes.com> (diakses tanggal 16 Januari 2009).
65. Carretero OA, Oparil S. Essential Hypertension. Part I: Definition and Etiology. *Circulation*. 2000;101:329-35.
66. Bowman TS, Gaziano JM, Buring JE, Sesso HD. A Prospective Study of Cigarette Smoking and Risk of Incident Hypertension in Women. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007;50(21):2085-92.
67. Tsuchiya K, Takiguchi Y, Okamoto M, Izawa Y, Kanematsu Y, Yoshizumi M, et al. Malfunction of Vascular Control in Lifestyle-Related Disease :

- Formation of Systemic Hemoglobin-Nitric Oxide Complex (HbNO) From Dietary Nitrite. *J Pharmacol Sci* 2004; 96:395-400.
68. Hu G, Barengo NC, Tuomilehto J, Lekke TA, Nissinen A, Jousilahti P. Relationship of Physical Activity and Body Mass Index to the Risk of Hypertension: a Prospective Study in Finland. *Hypertension* 2004;43:25-30.
 69. Blaustein MP, Zhang J, Chen L dan Hamilton BP. Molecular Mechanism Linking Salt to Hypertension. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*. 2006;290:514-23.
 70. Kawano Y, Tsuchihashi T, Matsuura H, Ando K, Fujita T dan Ueshima H. Report of the Working Group for Dietary Salt Reduction of the Japanese Society of Hypertension: (2) Assessment of Salt Intake in the Management of Hypertension. *Hypertension Research* 2007;30:887-93.
 71. Fortuño, Ana; Oliván, Sara; Beloqui, Oscar; San José, Gorka; Moreno, María U; Díez, Javier; Zalba, Guillermo. Association of increased phagocytic NADPH oxidase-dependent superoxide production with diminished nitric oxide generation in essential hypertension. *Journal of Hypertension*. 2004; 22(11):2169-75.
 72. Endemann DH. Endothelial Dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:1983-92.
 73. Fisher ND, Sorond FA, Hollenberg NK. Cocoa Flavanols & Brain Perfusion. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006;47:5210-4.
 74. Heiss C, Dejam A, Kleinbongard P, Schewe T. Vascular Effect of Cocoa Rich in Flavan-3-ols. *JAMA* 2003;290:1030-1.
 75. Ghosh D dan Scheepens A. Review: Vascular Action of Polyphenols. *Mol Nutr Food Res* 2009;53:322-31.
 76. Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Alexopoulos N, Aconomou E, Andreadou I, Stefanadis C. Effects of Dark Chocolate on Arterial Function in Healthy Individuals. *Am J Hypertens*. 2005;18:785-91.
 77. Jovellanos EC, Quíñones M, Muguerza B, Moulay L, Miguel M, Aleixandre A. Antihypertensive Effect of a Polyphenol-Rich Cocoa Powder Industrially Processed to Preserve the Original Flavonoids of the Cocoa Beans. *J Agric Food Chem*. 2009;57:6156-62.
 78. Hall WL, Formanuk NL, Harnpanich D, Cheung M, Talbot D, Chowienczyk PJ. A Meal Enriched with Soy Isoflavones Increases Nitric Oxide-Mediated Vasodilation in Healthy Postmenopausal Women. *J Nutr* 138;1288-92.

EFFECT OF DARK CHOCOLATE ON NO_x SERUM LEVEL AND BLOOD PRESSURE IN PREHYPERTENSION SUBJECTS

Verawati, Sukmaniah S, Siregar P

ABSTRACT

Objective. This study was conducted to investigate the effect of dark chocolate 30 g/day for fifteen day on NO_x serum level and blood pressure in male and female administration employee with prehypertension.

Methods. The study was a parallel clinical trial. A total of thirty two subjects who were selected using certain criteria divided into two groups using block randomization. Sixteen subjects received 30 g/day dark chocolate and dietary counseling (Treatment Group) and other 16 subjects received white chocolate 25 g/day and dietary counseling (Control Group) for fifteen days. Data collected in this study consist of age, physical activity, body massa index, intake of energy, sodium, and polyphenol, NO_x serum levels and blood pressure. Assessment on NO_x serum level were done in pre treatment and after treatment, while blood pressure were assessed in pre treatment, in treatment period and after treatment.

Results. Polyphenol intake in treatment periode in treatment group was significantly higher compared with control groups. After 15 days treatment, NO_x serum level between treatment and control groups was significantly different ($p=0,001$). Both group had decreased systolic and diastolic blood pressure. Systolic blood pressure was decreased significantly between groups after treatment ($p=0,001$), while diastolic blood pressure was not significant ($p=0,308$). Systolic and diastolic blood pressure pre and after treatment in treatment group were significantly decreased, while it was not significant in control group.

Conclusions. There was increased polyphenol intake in treatment group which increased serum NO_x level, significantly decreased systolic blood pressure while no significant decrease in diastolic blood pressure after 15 days treatment.

Keywords. Dark chocolate, polyphenol, NO_x serum level, prehypertension

INTRODUCTION

Prehypertension is usually defined as a systolic blood pressure between 120-139 mm Hg or diastolic blood pressure between 80-89 mm Hg.¹ The mean blood pressure in Indonesia at 25-34 years old are 124,7/79,9 mm Hg and there are positive correlation between age and blood pressure.²

Prehypertension patients have two folds risk to suffer from coronary heart disease or stroke compare with normotensive. Risk factors for prehypertension are obesity, age, high intake of energy and sodium, low physical activity and alcohol intake.³

Vascular disorders in prehypertension patients are influenced by decrease in synthesis and bioavailability of *nitric oxide* (NO) leading to endothelial dysfunction.⁴ Nitric oxide is a vasodilator produced in endothelium to maintain vascular tone.

Synthesis and bioavailability of NO influenced by arginine, Nitric Oxide Synthase (NOS) and superoxide anion.⁵ NO have fast half life, therefore in clinical analysis NO metabolite (NOx) is used as a marker NOS activity and NO production.⁶

Polyphenols are abundant in human diet. One class of polyphenol, flavanols based on clinical and epidemiology studies have protection effect on cardiovascular system.⁷ Flavanols are able to increase antioxidant plasma, decrease oxidation products and activate *endothelial Nitric Oxide Synthase* (eNOS) which will increase synthesis and bioavailability of NO that in turn will restore endothelial function.⁸

Dark chocolate is a major source of flavanols which have the highest antioxidant level compared with other food source based on Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) measurement.⁹ Studies had show that *dark chocolate* intake reduce blood pressure significantly.

Grassi et al studied effects of 100 g/day (88 mg flavanol) *dark chocolate* in hypertensive subjects for fifteen days, showed significant decrease of systolic and diastolic blood pressure.¹⁰ Taubert et al studied *dark chocolate* 6,3 g/day compared with *white chocolate* 5,6 g/day for 18 weeks in prehypertension and stage 1 hypertension subjects, the results showed significantly decrease in systolic and diastolic blood pressure in subjects received dark chocolate.¹¹

This study was a parallel randomized clinical trial, comparing two group, treatment group received dark chocolate 30 g/day and dietary counseling and the control group received white chocolate 25 g/day and dietary counseling for fifteen day on NOx serum level and blood pressure in male and female employee with prehypertension.

METHODS

Subjects

The study was a parallel randomized clinical trial. Ninety seven male and female employees of FKG-UPDM(B) and PT. ADM were participated and written informed consent were attained. Twelve subjects were not included in the study because their age were more than 44 years old. Six subjects were not classified as prehypertension. Nine subjects were not included because body mass index was obese (n=6) and underweight (n=3). Exclusion criteria were any history of taking antihypertension drug, smoking, alcohol intake and consumption of antioxidant vitamin (vitamin A, C or E) or antioxidant supplements. The final study group consisted of thirty two subjects, and were divided into two group using block randomization. Sixteen subjects in the treatment group and the other sixteen subjects in the control group. In the first and second day of treatment two subjects in treatment group repulse from the study. After fifteen days of intervention, fourteen subjects in the treatment group and sixteen subjects in the control group completed the study. This study were approved by the ethics committee of Medical Faculty Indonesia University.

Study Measurement

Body weight and height were measured to determined the body mass index (BMI). The subjects completed 2 x 24 hours food record to determine energy, sodium, and polyphenol intake.

Subjects were asked to fast 10-12 hours (overnight fast) before blood were drawn. Ten mL fasting blood was used to measure NOx serum level. Laboratory findings were done pre and after treatment.

Blood pressure were measured pre treatment, 8th day and after treatment. Measurement of blood pressure were using patient monitor device merk Bionet. The patient seated after five minutes rest, the blood pressure value were taken by average of two reading with five minutes interval between reading. The third measurement using standart sphygmomanometer and stetoscope was taking as a confirmation.

Statistical Analysis

All statistical calculation were performed with Statistical Package for Social Science (SPSS version 11,5) software. The normality test were assessed by Kolmogorov-Smirnov test. Differences in mean values were assessed by unpaired t-test for the normal distributed data or Mann Whitney for the abnormal one. Values of $p < 0,05$ were considered to indicate statistical significance.

RESULTS

Table 1. Characteristic of Base Line

Variable	Treatment	Control	p
Sex	1 (1-2) [#]	1 (1-2) [#]	0,619 ^m
Male	10 (71,43%)	10 (62,5%)	
Female	4 (28,57%)	6 (37,5%)	
Age (years)	36±7,42	33,44±6,08	0,304 ^{tt}
25-34	6 (42,86%)	8 (50%)	
35-44	8 (57,14%)	8 (50%)	
Education level	2 (1-3) [#]	2,5 (1-3) [#]	0,710 ^m
Low	1 (7,14%)	1 (6,25%)	
Middle	7 (50%)	7 (43,75)	
High	6 (42,8%)	8 (50%)	
Physical Activity	31,79±16,81	19,12±8,5	0,013 ^{tt}
Low	4 (28,57%)	8 (50%)	
Sufficient	4 (28,57%)	8 (50%)	
Average	6 (42,86%)	-	
Body Mass Index (kg/m ²)	23,5 (17,10-24,9) [#]	23,6 (17,22-24,3) [#]	0,559 ^m
Normal	6 (42,86%)	7 (43,75%)	
Overweight	8 (57,14%)	9 (56,25%)	
NOx serum level (µmol/L)	4,98±3,07	4,13 (0,37-41,95) [#]	0,868 ^m
Sysolic Blood Pressure (mm Hg)	128,64±5,89	128,12±7,72	0,837 ^{tt}
Diastolic Blood Pressure (mm Hg)	80,5±6,3	77,75±5,40	0,215 ^{tt}

* = significant; tt = unpaired t-test; m = mann whitney,
= median (minimum-maximum)

The characteristic of two groups at base line were not significantly different, except in physical activity index, where treatment group had higher physical activity index

compared with control group. The characteristic of the two groups were closely matched at base line.

Table 2. Average of Energy, Sodium and Polyphenol Intake Using Food Record 2 x 24 Hours Before Treatment, First and Second Week of Treatment Period

Variable	Treatment	Control	p
Energy (ccal)			
Pre treatment	2111,57±238,25	2157,86±595,66	0,9 ^{tt}
First week	1511,86±66,25 ^a	1973,14±225,14	0,073 ^{tt}
Second week	1759,14±232,36 ^a	2160,71±742,21	0,292 ^{tt}
Sodium (mg/day)			
Pre treatment	2271,57±244,96	2152,14±256,59	0,391 ^{tt}
First week	2130,86±182,73 ^a	2110,57±230,62	0,858 ^{tt}
Second week	2079,71±176,77 ^a	2010,29±185,99	0,488 ^{tt}
Polyphenol (mg/day)			
Pre treatment	128,86±73,32	136,14±86,25	0,868 ^{tt}
First week	316,43±70,46 ^a	141,43±88,14	0,002 ^{*tt}
Second week	369,14±91,61 ^a	172,29±136,80	0,01 ^{*tt}

a = 14 subjects; * = significant; tt = unpaired t-tes

Mean intakes of energy and sodium in both groups were not significantly different and were lower than Indonesian Recommended Dietary Allowance 2004. Polyphenol intake in first and second weeks between treatment and control groups were significantly different.

Table 3. Energy Intake and Percentage of Total Energy Expenditure

Variabel	Treatment	Control	p
Energy (ccal)			
Pre treatment	2111,57±238,25	2157,86±595,66	0,9 ^{tt}
8 th day	1511,86±66,2 ^a	1973,14±225,14	0,073 ^{tt}
After treatment	1759,14±232,36 ^a	2160,71±742,21	0,292 ^{tt}
Percentage of intake (%) ^b	88,74±8,40	83,24±6,442	0,224 ^{tt}

a = 14 subjects; tt = unpaired t-tes;

b = percentage of total energy expenditure

All subjects consumed energy similar to the recommended diet (80-120% of total energy requirement). Two subjects in control group complained dizziness early in second week after consuming white chocolate.

Table 4. NOx Serum Level Before and After Treatment

Variable	Treatment	Control	p
NOx serum level ($\mu\text{mol/L}$)			
Pre Treatment	4,98 \pm 3,07	4,13 (0,37-41,95)	0,868 ^m
After treatment	7,70 \pm 3,84 ^a	1,92 (-0,79-17,78)	0,001 ^{*m}
Changes (Δ)	2,72 \pm 2,22	-2.36 (-24,17-0,14) [#]	0,000 ^{*m}
p	0,001 ^{*t}	0,001 ^{*w}	

a = 14 subjects; * = significant ; m = mann whitney; w = wilcoxon; t = paired t-test

NOx serum level in treatment group increased significantly, while it was decreased significantly in control group. NOx serum level after treatment between treatment and control group was significantly different.

Table 5. Systolic and Diastolic Blood Pressure

Variable	Treatment	Control	p
Systolic (mm Hg)			
Pre treatment	128,64 \pm 5,89	128,12 \pm 7,72	0,837 ^{tt}
8 th Day	122,71 \pm 10,36 ^a	126,44 \pm 8,02	0,287 ^{tt}
After treatment	120,64 \pm 8,47 ^a	131,19 \pm 7,45	0,001 ^{*tt}
Change (Δ)	-8,00 \pm 5,67	-3,06 \pm 4,39	0,000 ^{*tt}
p	0,000 ^{*t}	0,432 ^t	
Diastolic (mm Hg)			
Pre treatment	80,5 \pm 6,3	77,75 \pm 5,40	0,215 ^{tt}
8 th Day	74,07 \pm 8,38 ^a	76,19 \pm 8,85	0,507 ^{tt}
After treatment	74,14 \pm 6,30 ^a	77,44 \pm 10,29	0,308 ^{tt}
Change (Δ)	-6,36 \pm 6,15	-0,31 \pm 7,24	0,021 ^{*tt}
p	0,009 ^{*t}	0,283 ^t	

a = 14 subjects * = significant; t = paired t-tests; tt = unpaired t-test

Both groups had decreased systolic and diastolic blood pressure. Systolic blood pressure was significantly decreased between groups after treatment ($p=0,001$), while diastolic blood pressure was not significant ($p=0,308$).

Table 6. Correlation between NOx serum level and Blood Pressure

	Δ NOx serum level	
	r^s	p
Δ Systolic blood pressure	-0,640	0,000*
Δ Diastolic blood pressure	-0,377	0,04*

* = significant ; r = coefficient correlation with correlation test Rank Spearman

^s = correlation coefficient r :

- 0 – 0,25 : no correlation-weak correlation
- 0,26 – 0,50 : moderate correlation
- 0,51 – 0,75 : strong correlation
- 0,76 – 1,00 : very strong correlation

There was significant strong negative correlation between the change of NOx serum level and the change of systolic blood pressure, while there was significant moderate negative correlation for the change of diastolic blood pressure.

DISCUSSION

Study limitation was the difficulty in blinding between dark chocolate and white chocolate though it was minimalized by putting the chocolate in the box with the same shape and colour. The limitations of nutrisurvey 2005 programme which was used to determine the nutrient intake were not enough database on local food. Laboratory findings used in this study was colorimetric Cayman to measure NOx serum level which is the sum of nitrite and nitrate as the metabolite of NO.¹²

Confounding variables in this study i.e age, sex, BMI, smoking, alcohol intake, sodium intake, and physical activity were controlled by restriction using exclusion criterias so the results were not bias.⁴³ The characteristic data of the two groups at base line were not significant different, except for physical activity index.

Twenty subjects in this study were male (66,67%) and ten were female (33,33%). The prevalence of prehypertension in male are higher than female because the production of aldosterone hormones from progesterone which will increase sodium absorption in kidney.^{2,13} The mean of age were $36 \pm 7,42$ years old. The mean of blood pressure in Indonesia at 25-34 years old are 124,7/79,9 mm Hg and will rise parallel with aging process.² Ages correlate with decrease of elasticity vascular walls which cause increase of perifer resistance.¹

Thirteen subjects in treatment group and fifteen subjects in control group have niddle and high educational level, it was not significantly different. Educational level was correlation with chocolate eating habits and complianess to fulfill the study experiment. Subjects with overweight were more than subject with normal BMI. In obese, the risk to increase blood pressure was 2-6 times compared with normal BMI. Body weight excess more than 20% from ideal body weight will increase prehypertension risk twice than non obese.³ Physical activity index were low because all subjects had static activity. Hu et al declared that low physical activity increased risk for hypertension.¹⁴ Theoretically, in low physical activity index there is a lack of pulsatile blood flow.⁴

The average intake of energy were lower than RDA 2004, because the physical activity index subjects were low and they just done static activity, but the percentage of Total Energy Requirement was normal (80-120%). Energy intake and body weight have positive correlation, meanwhile JNC 7 recommendation showed that normal energy intake could maintain normal body weight.¹ Sodium intake analysis to determine sodium content in food were difficult.¹⁵ The average sodium intake were lower than RDA 2004 (1500-2400 mg/day)¹⁶ Sodium intake and blood pressure have positive correlation, high intake of sodium will induced kidney to increase sodium excretion leading to increase plasma volume and cardiac output.³ The analysis of polyphenol was done manually using list of polyphenol content in food sources.¹⁷ The limitations were difficulty in determining polyphenol content in food, therefore it could underestimated or overestimated. In treatment period the polyphenol intake in treatment group was higher than control group, the difference was assumed because of polyphenol content in dark chocolate.

NOx serum level in all subjects were low. Fortuño et al proposed that NOx serum level was decrease in hypertension subjects because lack of arginine as substrate for NO synthesis.^{18,19} After 15 days treatment, NOx serum level between treatment and control groups was significantly different ($p=0,001$). Pre and after treatment, NOx serum in treatment group was higher ($p=0,001$), while it was lower in control group ($p=0,001$). This was suit with Fisher et al which proposed that polyphenol increase regulation of eNOS transcription to increase NO synthesis.²⁰ Heiss et al also found that flavanol in chocolate have a capability to increase bioactivity of NO.²¹

Both groups had decreased systolic and diastolic blood pressure, maybe this was caused by dietary counseling. Izzo et al who said that dietary counseling was able to decreased blood pressure.¹³ Systolic and diastolic blood pressure decrease significantly in treatment group, assumed because of polyphenol content in dark chocolate. Ghosh et al stated that vascular effect from polyphenol decrease blood pressure.²² Systolic blood pressure was decreased significantly between groups after treatment ($p=0,001$), while diastolic blood pressure was not significant ($p=0,308$). This is relevant with studies by Grassi et al²³, Fraga et al²⁴ and Vlachopoulos²⁵ et al but not similar with Grassi et al¹⁰ and Taubert et al¹¹. This study used a small dose of dark chocolate and more short treatment period, this might influence the decrease in blood pressure. The ABPM used in Grassi et al¹⁰ was more accurate than patient monitor used in this study which also might influence the findings in this study.

There was significant strong negative correlation between the change of NOx serum level and the change of systolic blood pressure, while there was significant moderate negative correlation for the change of diastolic blood pressure. Hall et al confirmed that increase NOx serum level will increase vasodilatation in vascular endothel, in turn will decrease blood pressure.²⁶

In conclusions, the effects of dark chocolate 30 g per day during fifteen days increased NOx serum level, significantly decreased systolic blood pressure but not significantly decreased diastolic blood pressure.

REFERENCES

1. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention,

- Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: The JNC 7 Report. *JAMA* 2003; 289:2560-72.
2. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan Republik Indonesia. *Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT)* 2004. Volume 2. Jakarta: Litbangkes.
 3. Couch SC, Krummel DA. Medical Nutrition Therapy for Hypertension. In: Mahan LK, Escott-Stump S, editors. *Krause's Food and Nutrition Therapy*. 12th ed. Missouri: Saunder Elsevier. 2008. p.865-83.
 4. Foëx P. Hypertension: Pathophysiology and Treatment. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*. 2004;4(3):71-5.
 5. Drexler H. Review: Nitric Oxide and Coronary Dysfunction in Humans. *Cardiovascular research*. 1999;43:572-9.
 6. Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PLM. Nitrite and Nitrate Determination in Plasma: A Critical Evaluation. *Clin Chem*. 1995;41(6):892-6.
 7. Erdman JW, Carson L, Uribe C, Evans EM dan Allen RR. Effect of Cocoa Flavanols on Risk Factors for Cardiovascular Disease. *Asia Pac J Clin Nutr* 2008;17(S1):284-7.
 8. Engler MB, Engler MM, Chen CY, Malloy MJ, Browne A, Chiu EY et al. Flavonoid-rich Dark Chocolate Improves Endothelial Function and Increase Plasma Epicatechin Concentration in Healthy Adults. *J Am Coll Nutr* 2004; 23(3):197-04.
 9. Engler MB. The Emerging Role of Flavonoid-rich Cocoa and Chocolate in Cardiovascular Health and Disease. Business Briefing : US Cardiology 2004. dari http://www.touchcardiology.com/files/article_pdfs/5217.pdf diakses tanggal 18 November 2009.
 10. Grassi D, Necozione S, Lippi C, Groce G, Valeri L, Pasqualetti P et al. Cocoa Reduces Blood Pressure and Insulin Resistance and Improves Endothelium-dependent Vasodilatation in Hypertensive. *Hypertension* 2005;46:398-405.
 11. Taubert D, Roesen R, Lehmann C, Jung N dan Schomig E. Effects of Low Habitual Cocoa Intake on Blood Pressure and Bioactive Nitric Oxide. *JAMA* 2007;298:49-60.
 12. Lundberg JO, Weitzberg E. NO Generation From Nitrite and Its Role in Vascular Control. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:915-22.
 13. Izzo JL. Prehypertension: Demographics, Pathophysiology, and Treatment. *Current Hypertension Report* 2007;9:264-8.
 14. Hu G, Barengo NC, Tuomilehto J, Lekke TA, Nissinen A, Jousilahti P. Relationship of Physical Activity and Body Mass Index to the Risk of Hypertension: a Prospective Study in Finland. *Hypertension* 2004;43:25-30.
 15. Kawano Y, Tsuchihashi T, Matsuura H, Ando K, Fujita T dan Ueshima H. Report of the Working Group for Dietary Salt Reduction of the Japanese Society of Hypertension: (2) Assessment of Salt Intake in the Management of Hypertension. *Hypertension Research* 2007;30:887-93.
 16. Widyakarya Nasional Pangan dan Gizi 2004. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. *Angka Kecukupan Gizi Indonesia (Rata-Rata Per Orang Per Hari)*. 2004.
 17. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C dan Jimenez L. Polyphenols: Food Sources and Bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004;79:727-47.

18. Fortuño, Ana; Oliván, Sara; Beloqui, Oscar; San José, Gorka; Moreno, María U; Díez, Javier; Zalba, Guillermo. Association of increased phagocytic NADPH oxidase-dependent superoxide production with diminished nitric oxide generation in essential hypertension. *Journal of Hypertension*. 2004; 22(11):2169-75.
19. Endemann DH. Endothelial Dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:1983-92.
20. Fisher ND, Sorond FA, Hollenberg NK. Cocoa Flavanols & Brain Perfusion. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006;47:5210-4.
21. Heiss C, Dejam A, Kleinbongard P, Schewe T. Vascular Effect of Cocoa Rich in Flavan-3-ols. *JAMA* 2003;290:1030-1.
22. Ghosh D dan Scheepens A. Review: Vascular Action of Polyphenols. *Mol Nutr Food Res* 2009;53:322-31.
23. Grassi D, Lippi C, Necozione S, Desideri G, Ferri C. Short-term Administration of Dark Chocolate is Followed by a Significant Increase in Insulin Sensitivity and a Decrease in Blood Pressure in Healthy Person. *Am J Clin Nutr* 2005;81:611-4.
24. Fraga CG. Cocoa, Diabetes, and Hypertension: Should We Eat More Chocolate? *Am J Clin Nutr* 2005;81:541-2.
25. Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Alexopoulos N, Aconomou E, Andreadou I, Stefanadis C. Effects of Dark Chocolate on Arterial Function in Healthy Individuals. *Am J Hypertens*. 2005;18:785-91.
26. Hall WL, Formanuk NL, Hampanich D, Cheung M, Talbot D, Chowienczyk PJ. A Meal Enriched with Soy Isoflavones Increases Nitric Oxide-Mediated Vasodilation in Healthy Postmenopausal Women. *J Nutr* 138;1288-92.

LEMBAR PERSETUJUAN KOMITE ETIK



UNIVERSITAS INDONESIA

FAKULTAS KEDOKTERAN

Jalan Salemba Raya No. 6, Jakarta Pusat

Pos Box 1358 Jakarta 10430

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

NOMOR : *Cy* IPT02.FK/ETIK/2010

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK

ETHICAL -- CLEARANCE

Panitia Tetap Penilai Etik Penelitian, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul:
The Committee of The Medical research Ethics of the Faculty of Medicine, University of Indonesia, with regards of the Protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled:

"Pengaruh Dark Chocolate Terhadap Kadar NOx Serum dan Tekanan Darah Penderita Prahipertensi di FKG Universitas Moestopo Jakarta".

Peneliti Utama : dr. Verawati
Name of the principal investigator

Nama Institusi : Ilmu Gizi FKUI/RSCM

dan telah menyetujui protocol tersebut di atas. *valuasi and approved the above mentioned proposal.*

Jakarta, 15 Februari 2010

Chairman
Ketua

Prof. Dr. dr. Agus Firmansyah, SpA(K)

-Peneliti wajib menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian.

LAMPIRAN 2

LEMBAR INFORMASI PENELITIAN

Yth. Saudara-saudari,

Dengan ini kami menjelaskan bahwa tekanan darah prahipertensi merupakan resiko terjadinya penyakit jantung & pembuluh darah. Untuk itu akan diadakan penelitian pada karyawan laki-laki dan perempuan usia 25-44 tahun dengan tekanan darah prahipertensi mengenai pengaruh pemberian coklat pekat terhadap penurunan tekanan darah dan kadar NO_x serum selama 15 hari. Apabila saudara bersedia mengikuti penelitian ini, maka akan dilakukan :

1. Wawancara mengenai usia, riwayat penyakit hipertensi.
2. Pencatatan kebiasaan makan dan jumlah makanan yang dikonsumsi sebanyak empat kali.
3. Pengambilan darah sebanyak 10 mL (± 1 sendok makan) yang dilakukan sebanyak dua kali pada sebelum dan akhir penelitian untuk mengetahui kadar NO_x serum.
4. Pemeriksaan tekanan darah dilakukan sebelum perlakuan, satu kali pada masa perlakuan dan sesudah perlakuan.
5. Penyuluhan gizi sebanyak 3 kali yang berisi diet seimbang tanpa mengubah kebiasaan makan.
6. Pemberian coklat pekat 30 g/hari atau coklat putih 25 g/hari yang dikonsumsi selama 15 hari berturut-turut.

Akibat pengambilan darah mungkin saudara akan merasakan sedikit ketidaknyamanan atau sakit, namun hal ini diminimalkan dengan pengambilan darah oleh tenaga yang terlatih dan menggunakan jarum suntik yang steril dan kecil. Saat mengonsumsi coklat pekat atau coklat putih mungkin timbul gejala mual dan migrain, namun hal ini hanya bersifat minimal dan hanya pada individu yang sensitif.

Keikutsertaan saudara di dalam penelitian ini bersifat sukarela dan saudara dapat menolak atau mengundurkan diri selama proses penelitian berlangsung.

Keuntungan bagi saudara apabila ikut serta dalam penelitian ini adalah dapat mengetahui keadaan kesehatan dan status gizi serta menurunkan dan mencegah peningkatan tekanan darah.

Semua data pada penelitian ini bersifat rahasia sehingga tidak memungkinkan orang lain mengetahuinya.

Apabila saudara bersedia ikut serta dalam penelitian ini, maka kami akan mohon kesediaannya untuk dapat menandatangani surat persetujuan menjadi peserta penelitian :

**PENGARUH *DARK CHOCOLATE* TERHADAP KADAR NO_x SERUM DAN
TEKANAN DARAH PENDERITA PRAHIPERTENSI**

Hal-hal yang belum jelas dalam penelitian ini dapat ditanyakan secara langsung atau melalui telepon pada penanggung jawab penelitian ini yaitu dr. Verawati melalui telepon rumah 021-7392090, dan HP 08128061586.

Atas kesediaan saudara, kami ucapkan terima kasih

Universitas Indonesia

LEMBAR PERSETUJUAN

(Informed Consent)

**PROGRAM STUDI ILMU GIZI KLINIK
PROGRAM PENDIDIKAN PASCASARJANA
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA**

SURAT PERSETUJUAN MENJADI PESERTA PENELITIAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama lengkap : _____

Usia : _____

Alamat lengkap : _____

Setelah mendengar dan membaca penjelasan mengenai tujuan dan manfaat penelitian tersebut dengan judul

**PENGARUH *DARK CHOCOLATE* TERHADAP KADAR NO_x SERUM DAN
TEKANAN DARAH PENDERITA PRAHIPERTENSI**

Menyatakan dengan sukarela menyetujui diikutsertakan dalam penelitian tersebut dengan catatan bila sewaktu-waktu dirugikan dalam bentuk apapun berhak membatalkan persetujuan ini.

Jakarta,.....2010

Mengetahui
Penanggung jawab

Menyetujui
Peserta penelitian

(dr. Verawati)

(.....)

Saksi

(.....)

DATA KARAKTERISTIK SUBYEK

Tanggal pemeriksaan :

No. Kode Subyek :

BIODATA

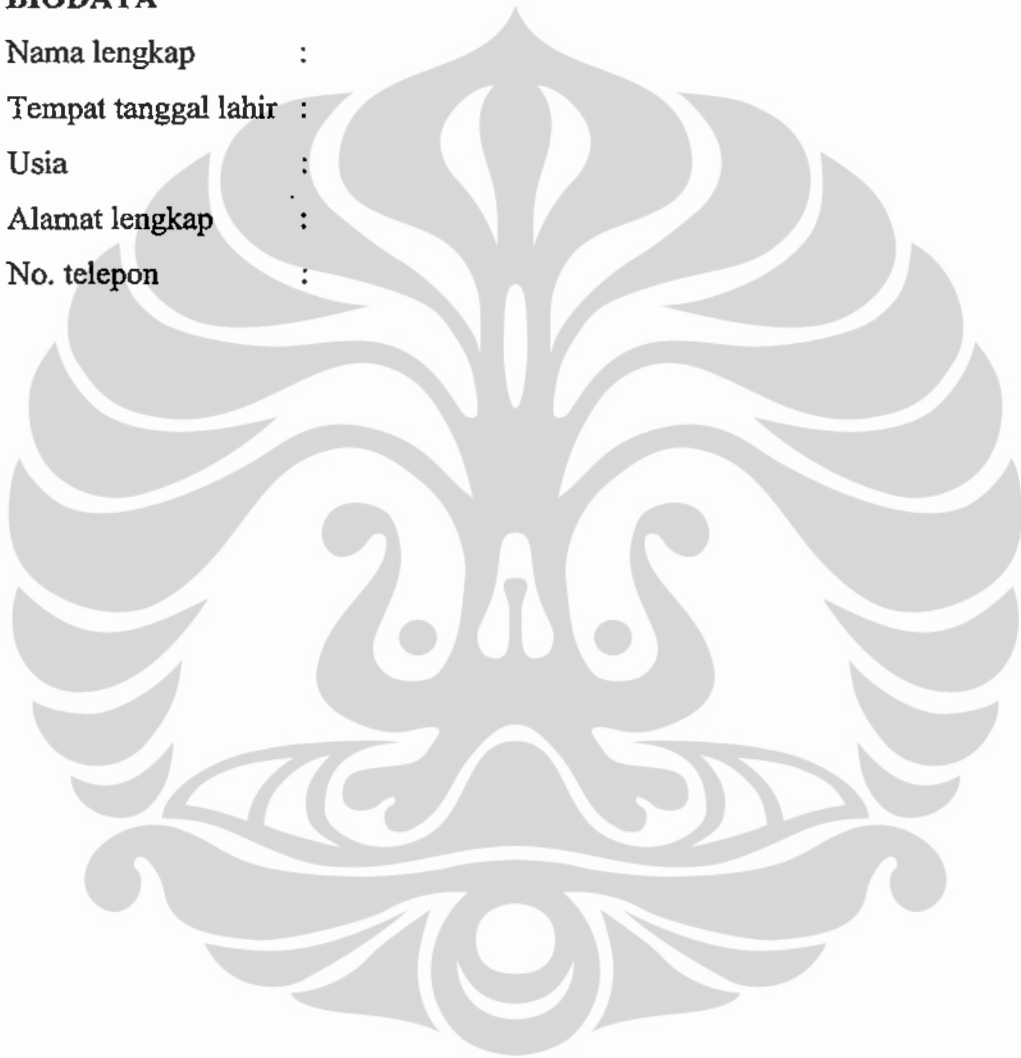
Nama lengkap :

Tempat tanggal lahir :

Usia :

Alamat lengkap :

No. telepon :



LAMPIRAN 5

LEMBAR SELEKSI DAN RIWAYAT PENYAKIT

Tanggal pemeriksaan :

Nama subyek :

No. Kode subyek :

Kriteria penerimaan	Ya	Tidak
a. Apakah subyek berusia 25-44 tahun ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
b. Apakah IMT subyek adalah 18,5-24,9 kg/m ² BB ₁ :kg; BB ₂ :kg; Rerata BB :kg; TB ₁ :cm; TB ₂ :cm; Rerata TB :cm IMT :kg/m ²	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
c. Apakah subyek memiliki tekanan darah prahipertensi (120-139&/80-89 mm Hg)?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
d. Apakah subyek menandatangani lembar persetujuan ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kriteria penolakan	Ya	Tidak
a. Apakah subyek memiliki riwayat keluarga penyakit hipertensi?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
b. Apakah subyek sedang/pernah mengonsumsi obat antihipertensi?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
c. Apakah subyek selama ini merokok aktif?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
d. Apakah subyek selama ini mengonsumsi alkohol?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
e. Apakah subyek selama ini mengonsumsi suplemen vitamin atau antioksidan ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
f. Apakah saudara sedang hamil/menyusui ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
g. Apakah saudara sudah menopause ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Memenuhi kriteria sebagai subyek penelitian ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Jenis	Nama makanan	Bahan makanan	URT
Selingan siang			
Jam.....			
Makan malam			
Jam.....			
Selingan malam			
Jam.....			

Keterangan :

URT : Ukuran Rumah Tangga

LAMPIRAN 7

LEMBAR KELUHAN SUBYEK

Tanggal pemeriksaan :

Nama subyek :

No. kode subyek :

	Keluhan umum	Keluhan pencernaan
Minggu I		
Minggu II		

LAMPIRAN 8

Lembar Hasil Pemeriksaan Klinis

Tanggal pemeriksaan :

Nama subyek :

No. kode subyek :

HASIL PEMERIKSAAN ANTROPOMETRI

No.	Pengukuran	Hasil
1.	BB (kg)	
2.	TB (m)	
3.	IMT (kg/m^2)	

HASIL PEMERIKSAAN LABORATORIUM

No.	Pemeriksaan	Hasil	
		Pra perlakuan	Pasca perlakuan
1	NOx serum ($\mu\text{mol}/\text{L}$)		

HASIL PEMERIKSAAN TEKANAN DARAH

No.	Tekanan darah	Hasil		
		Praperlakuan	H8	Pasca perlakuan
1	Sistolik			
2	Diastolik			

Lembar Indeks Aktivitas Fisik (IAF)

Tanggal pemeriksaan :

Nama subyek :

No. Kode subyek :

Olah raga saat ini :

(Lingkari pada nilai yang tertera)

1. Frekuensi (F)

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

2. DURASI (D)

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

3. Intensitas (I)

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

NILAI : I x D x F =

Interpretasi :

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

Catatan : Bila saudara melakukan 2 atau > jenis olahraga, Indeks Aktivitas Fisik saudara (nilai total) adalah jumlah dari dua atau > IAF.



Contoh Aktivitas Fisik

Aktivitas	MET
Sepeda, di tempat, 50 W, sangat ringan, untuk latihan	3,0
Sepeda, 10 W, umum, senggang, ke tempat kerja atau untuk santai	4,0
Sepeda, di tempat, 100 W, ringan, untuk latihan	5,5
Sepeda, di tempat, 150 W, sedang	7,0
Sepeda, di tempat, 200 W, berat	10,5
Kalistenik, ringan atau sedang, umum	4,5
Kalistenik, berat	8,0
Angkat beban, ringan atau sedang	3,0
Olahraga kesehatan bersama, umum	5,5
Treadmill, bertingkat, umum	6,0
Dayung, di tempat, 50 W, ringan	3,5
Dayung, di tempat 100 W, ringan	7,0
Dayung, di tempat, 150 W, berat	8,5
Peregangan	4,0
Pelatih klas aerobik	6,0
Latihan aerobik di air, kalistenik di air	4,0
Aerobik, umum	6,0
Aerobik, <i>low impact</i> (ringan)	5,0
Aerobik, <i>high impact</i> (tinggi, berat)	7,0
Menari (<i>dancing</i>), umum	4,5
Menari perlahan	3,0
Menari (cepat)	5,5
<i>Jogging</i> , umum	7,0
Lari, 5 mph (12 min/mile)	8,0
Lari, 6 mph (10 min/mile)	10,0
Lari, 7 mph (8,5 min.mile)	11,5
Lari 7,5 mph (8 min/mile)	12,5
Lari, di tempat	8,0
Badminton, bukan pertandingan, tunggal dan ganda, umum	4,5
Basket, bukan pertandingan, umum	6,0
Basket, pertandingan	8,0
Basket, memasukkan bola (<i>shooting</i>)	4,5
Bilyard	2,5
Bowling	3,0
Golf, umum	4,5
Judo, karate, tae kwon do	10,0
Panjat tebing, umum	8,0
Panjat tebing, cepat	12,0
Lompat tali, sedang, umum	10,0
Lompat tali, lambat	8,0
Sepakbola, santai, umum	7,0
Sepakbola, pertandingan	10,0
Tennis, umum	7,0
Tennis, tunggal	8,0

Aktivitas	MET
<i>Tennis</i> , ganda	6,0
<i>Volley</i> , bukan pertandingan	3,0
<i>Volley</i> , pertandingan	4,0
Jalan, kurang dari 2 mph, lambat, permukaan datar	2,5
Jalan, 2,5 mph, permukaan normal	3,0
Jalan, 3,5 mph, bertingkat, langkah pendek, permukaan normal	4,0
Jalan, 3,5 mph, naik bukit	6,0
Jalan, 4 mph, level, permukaan datar, langkah pendek	4,0
Jalan, 4,5 mph, level, permukaan normal, langkah sangat pendek	4,5
Jalan, untuk santai, jalan bersama anjing	3,5
Jalan ke tempat kerja atau kelas	4,0
Menyelam (<i>snorkeling</i>)	5,0
<i>Softball</i> atau baseball, cepat atau lambat, umum	5,0
<i>Surfing</i>	3,0
Renang laps, gaya bebas, cepat, upaya berat	10,0
Renang laps, gaya bebas, lambat, sedang atau ringan	8,0
Renang, gaya punggung, umum	8,0
Renang, gaya dada, umum	10,0
<i>Skating</i> , ice, umum	7,0

Kategori Aktivitas Fisik

1. Aktivitas Fisik Ringan
< 5 MET atau < 6 kkal/menit
2. Aktivitas Fisik Sedang
5-7 MET atau 6-8 kkal/menit
3. Aktivitas Fisik Berat
> 7 MET atau > 8 kkal/menit

PROSEDUR PEMERIKSAAN LABORATORIUM NO, SERUM

Metoda : Colorimetric Griess Assays

Alat ukur : *Elisa reader*

Alat dan Bahan :

- | | |
|--|----------|
| 1. <i>Nitrate/Nitrite Assay Buffer</i> | : 1 vial |
| 2. <i>Nitrate Reductase Enzyme Preparation</i> | : 2 vial |
| 3. <i>Nitrate Reductase Cofactor Preparation</i> | : 2 vial |
| 4. <i>Nitrate Standart</i> | : 1 vial |
| 5. <i>Nitrite Standart</i> | : 1 vial |
| 6. <i>Griess Reagent I</i> | : 2 vial |
| 7. <i>Griess Reagent II</i> | : 2 vial |
| 8. <i>98-Well Plate</i> | : 3 buah |
| 9. <i>Plate Cover Sheet</i> | : 3 buah |
| 10. <i>Plate Reader 540 nm</i> | : 1 buah |

Persiapan Reagen

Beberapa komponen berupa konsentrat sehingga perlu diencerkan sebelum digunakan.

1. *Assay Buffer*

Larutkan material dalam botol *Assay Buffer* menjadi 100 mL dengan air *UltraPure*. *Assay Buffer* ini digunakan untuk melarutkan sampel sesuai kebutuhan.

2. *Nitrate Reductase*

Rekonstitusi nitrat reduktase dengan 1,2 mL *Assay Buffer*. Simpan dalam es selama penggunaan. Pembekuan dan pencairan larutan ini hanya dilakukan satu kali.

3. *Enzyme Cofactors*

Rekonstitusi *enzyme cofactors* dengan 1,2 mL *Assay Buffer*. Simpan dalam es selama penggunaan. Pembekuan dan pencairan larutan ini hanya dilakukan satu kali.

4. *Nitrate Standart*

Tutup botol dibuka secara perlahan untuk meminimalkan guncangan pada bubuk konsentrat. Isi botol direkonstitusi dengan 1,0 mL *Assay Buffer*. Diaduk dan dicampur secara merata untuk meyakinkan semua bubuk terlarut dengan baik..

5. *Nitrite Strandart*

Tutup botol dibuka secara perlahan untuk meminimalkan guncangan pada bubuk konsentrat. Isi botol direkonstitusi dengan 1,0 mL *Assay Buffer*. Diaduk dan dicampur secara merata untuk meyakinkan semua bubuk terlarut dengan baik.

6. *Griess Reagents R1 dan R2*

Tidak dilakukan penambahan apapun pada reagen ini, karena reagen ini siap digunakan.

Prosedur Kerja

Pengukuran kadar nitrat dan nitrit

1. Ditambahkan 200 μL air atau *Assay Buffer* ke dalam sumur blanko.
2. Ditambahkan larutan *Assay Buffer* ke dalam sampel sampai volume 80 μL dan masukkan dalam sumur larutan yang ditentukan.
3. Ditambahkan 10 μL campuran *Enzyme Cofactor* ke dalam setiap sumur (standart dan yang tidak diketahui).
4. Ditambahkan 10 μL campuran *Nitrate Reductase* ke dalam setiap sumur (standart dan yang tidak diketahui).
5. *Plate* ditutup dengan *plate cover* dan inkubasikan pada suhu ruangan selama 1 jam.
6. Setelah mencapai waktu inkubasi, ditambahkan 50 μL *Griess Reagent R1* ke dalam setiap sumur standart dan yang tidak diketahui.
7. Segera ditambahkan 50 μL *Griess Reagent R2* ke dalam setiap sumur (standart dan yang tidak diketahui).
8. Dibiarkan selama 10 menit dalam suhu ruangan supaya terbentuk warna.
9. Dibaca absorbansi pada 540 nm menggunakan alat ukur.

Perhitungan

Pengurangan blanko

- Dihitung rata-rata nilai absorbansi dari sumur blanko dan digunakan untuk mengurangi absorbansi dari semua sumur sampel.

Plotting kurva standar

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



Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit

Catalog No. 780001

CONTENTS OF THE KIT

Number	Item	Quantity	Storage of Kit Components
1	Nitrate/Nitrite Assay Buffer	1 vial	4°C
2	Nitrate Reductase Enzyme Preparation	2 vials	-20°C
3	Nitrate Reductase Cofactor Preparation	2 vials	-20°C
4	Nitrate Standard	1 vial	4°C or Room Temperature
5	Nitrite Standard	1 vial	4°C or Room Temperature
6	Griess Reagent R1	2 vials	4°C
7	Griess Reagent R2	2 vials	4°C
8	96-Well Plate	3 plates	Room Temperature
9	Plate Cover Sheet	3 covers	Room Temperature

PRE-ASSAY PREPARATION

Preparation of Reagents

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

1. Assay Buffer

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

2. Nitrate Reductase (vial #2)

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

3. Enzyme Cofactors (vial #3)

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

4. Nitrate standard (vial #4)

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

5. Nitrite standard (vial #5)

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

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

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

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

PIPETTING HINTS

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

Sample Preparation

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

1. Urine samples

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

2. Culture Media

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

3. Plasma and serum samples

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

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

4. Tissue homogenates

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

Plate Configuration

There is no specific pattern for using the wells on the plate. However, it is necessary to have some wells (at least 2) designated as absorbance blanks (containing 200 μ l of Assay Buffer or water). The absorbance of these wells must then be subtracted from the absorbance measured in all the other wells. Standard curves for nitrate and nitrite must also be included. If you plan to measure only total NO products (nitrate + nitrite), only the nitrate standard curve is required. If only nitrite is being measured, then only the nitrite standard curve is needed. The wells for the standard curves have been designated (as in A1-H2) in the instructions below. However, these standard curves can be placed in any wells you choose. The remaining wells on the plate can then be used for the assay of your samples. We suggest you record the contents of each well on the template sheets provided (See page 10).

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

MEASUREMENT OF NITRATE + NITRITE

Preparation of nitrate standard curve

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

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

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

Preparation of Samples for total nitrate + nitrite measurement

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

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

Performing the assay

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

MEASUREMENT OF NITRITE

Preparation of Nitrite standard curve

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

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

*UltraPure water can also be used

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

Measurement of sample nitrite

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

Performing the assay

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

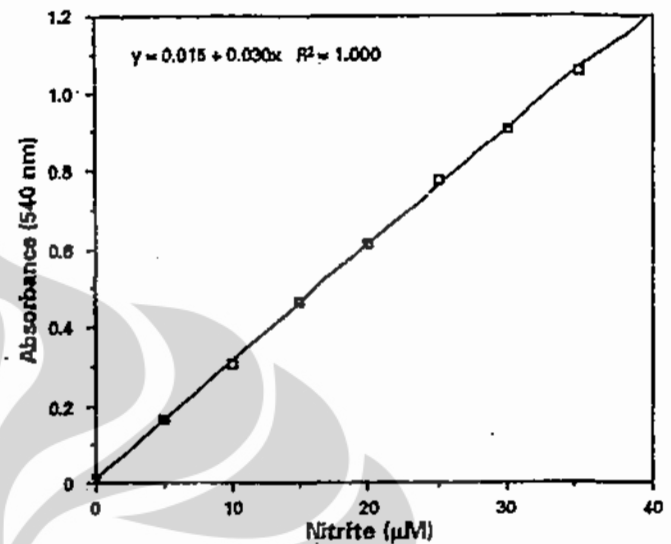
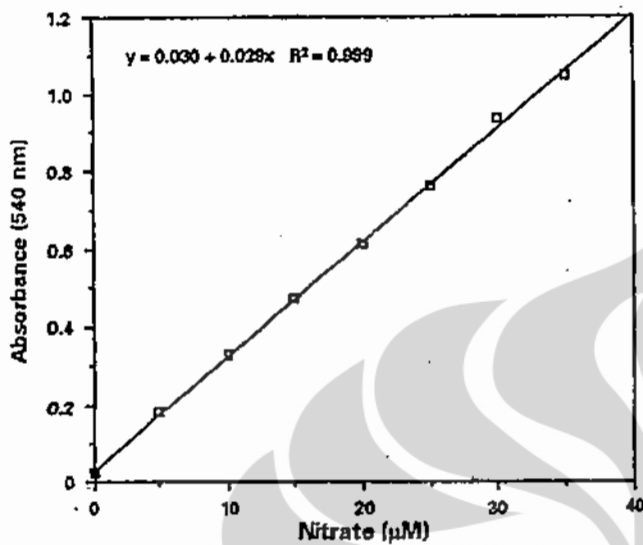
CALCULATIONS

Subtract the blanks

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

Plotting the standard curves

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



Determination of sample nitrate or nitrite concentrations

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

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

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

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Interferences

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

Sensitivity

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

TROUBLESHOOTING

Problem: Erratic values; dispersion of duplicates.

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

Problem: No color development in nitrate standard curve.

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

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

PROSEDUR RANDOMISASI BLOK

Kelompok perlakuan : A
 Kelompok kontrol : B
 Besar sampel : 32 orang
 Jumlah subyek tiap blok : 4 orang

1. Nama subyek berdasarkan alfabet diblok masing-masing untuk setiap 4 orang.
2. Jumlah kemungkinan kombinasi daftar blok

$$\frac{4!}{(4/2!) (4/2!)} = \frac{4 \times 3 \times 2 \times 1}{(2 \times 1) (2 \times 1)} = 6$$

Enam variasi blok yaitu :

(1) AABB (3) BBAA (5) ABBA
 (2) ABAB (4) BABA (6) BAAB

3. Dengan mata tertutup secara acak ditunjuk satu titik pada tabel angka random.
4. Didapatkan angka 4 sebagai nomor pertama, kemudian dicatat nomor bilangan mulai dari tempat yang ditunjuk diteruskan ke bilangan berikut di bagian bawahnya. (mis. 4, 2, 5, 1, 1, 3, 2, 2, 6 dst)
5. Kemudian ganti nomor bilangan tersebut sesuai letak nomor tersebut di dalam kombinasi daftar blok seperti di bawah ini.

(4) (2) (5) (1) (1)
 BABA ABAB ABBA AABB AABB

(3) dst.
 BBAA

6. Sekuen kode kelompok diurutkan berdasarkan urutan blok berdasarkan alfabet. Selanjutnya dimasukkan dalam amplop tertutup dan diserahkan kepada subyek.

No. Amplop	Subyek	No. Amplop	Subyek
1.	B	6.	A
2.	A	7.	A
3.	B	8.	B
4.	A	9.	B
5.	A	10.	A, dan seterusnya

LAMPIRAN 12

CONTOH MENU DIET SEIMBANG SEHARI

Dalam Satuan Penukar

Waktu	Bahan Makanan	Menu 1	Menu 2	Energi (kkal)		
				1700	1900	2100
07.00	Karbohidrat	Mie goreng	Roti panggang	1	1 ½	1 ½
	Hewani	Telur rebus	Telur dadar	1	1	1
	Nabati			½	½	1
	Sayur	Sawi hijau	Selada	S	S	S
	Minyak			1	2	2
10.00	Buah	Melon	Pepaya	1	1	1
13.00	Karbohidrat	Nasi	Nasi	2	2	2
	Hewani	Ayam goreng	Pepes ikan	1	1	1
	Nabati	Tahu telur	Perkedel	1	1	1
	Sayur	Sayur asem	Gado-gado	S	S	S
	Minyak			2	2	2
16.00	Roti	Kue basah	Kue kering	-	-	1
	Buah	Pepaya	Jeruk	1	1	1
19.00	Karbohidrat	Nasi	Nasi	2	2	2
	Hewani	Ikan tim	Ayam panggang	1	1	1
	Nabati	Telur tim	Tahu isi	1	1	1
	Sayur	Sayur lodeh	Sayur terong	S	S	S
	Minyak			2	2	2

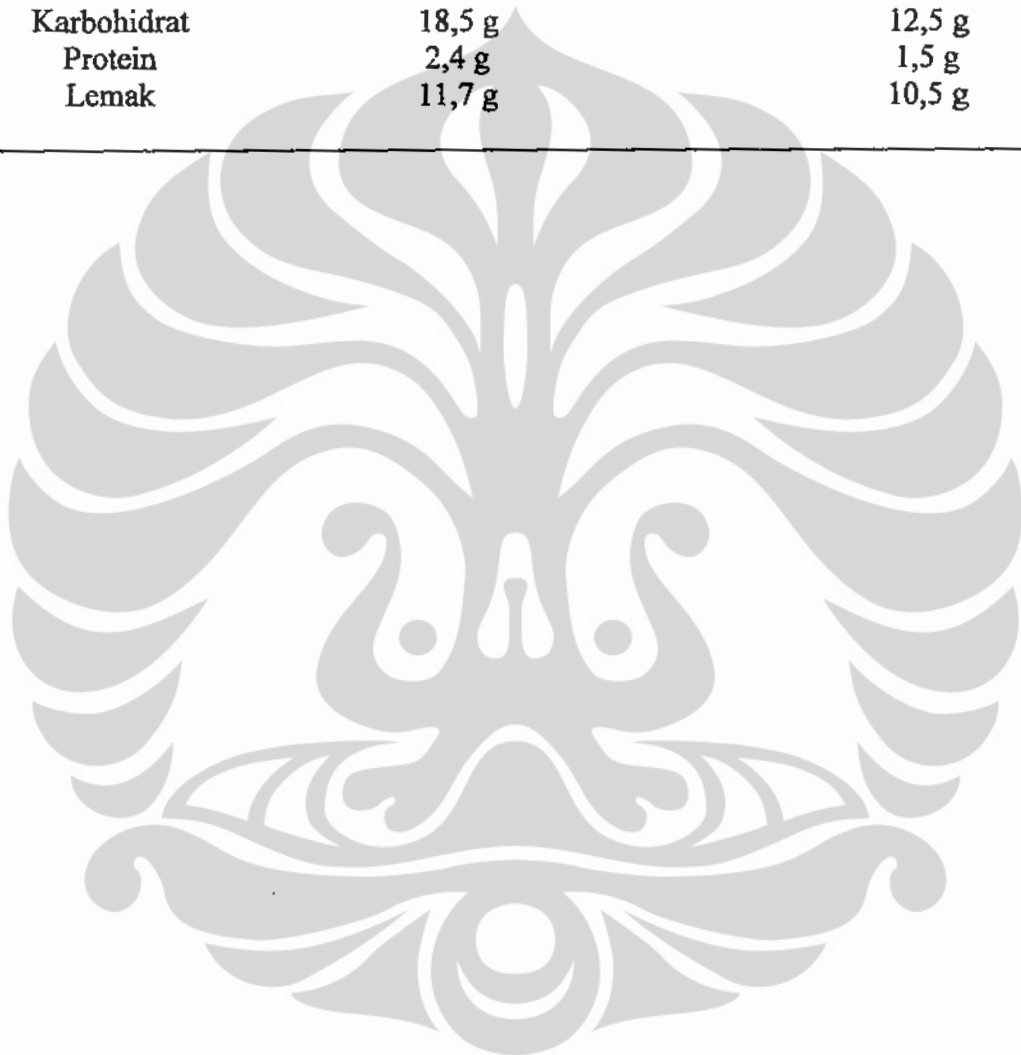
Keterangan :

- Komposisi diet seimbang : karbohidrat 60%, lemak 25%, protein 15% dari kalori total.
- S : sekehendak.
- Jumlah penukar setiap waktu makan dapat disesuaikan dengan kebiasaan makan individu, tanpa mengubah jumlah penukar total sehari.
- Konsumsi natrium \leq 2400 mg/hari, tidak merokok, dan minum alkohol.

LAMPIRAN 13

KANDUNGAN NUTRISI *DARK CHOCOLATE* DAN *WHITE CHOCOLATE*

Zat gizi	<i>Dark chocolate</i> (dalam 30 g)	<i>White chocolate</i> (dalam 25 g)
Kalori	150 kkal	150 kkal
Karbohidrat	18,5 g	12,5 g
Protein	2,4 g	1,5 g
Lemak	11,7 g	10,5 g



LAMPIRAN 14

KANDUNGAN POLIFENOL DAN FLAVANOL *DARK CHOCOLATE*

LIPI

LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
PUSAT PENELITIAN BIOTEKNOLOGI

LABORATORIUM UJI BIOTEKNOLOGI

Jl. Raya Bogor, KM 46 Cibinong 16911, Kabupaten Bogor, Indonesia P.O Box 208 Bogor
Telp. 021-87905152 - 8754587 (sentral) Fax. 021-87905152 - 8754588 (sentral)
e-mail : labujibiotek@biotek.lipi.go.id, website : http://www.lipi.go.id/biotek

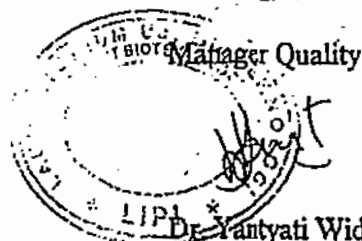
LAPORAN HASIL UJI

Report of Test Result

Nomor Hasil Uji : 008/LUB/I/2010
Test Result Number
 Nomor Kode Sampel : 137/PO/01-10
Sample Code Number
 Nama/Instansi Pengirim : Verawati
Name of Principal
 Alamat Pengirim : Jakarta
Address of Principal
 Tanggal Penerimaan Sampel : 6 Januari 2010
Date of Sample Received
 Jenis Sampel : Guylian (Dark Chocolate 70 %)
Subject of sample
 Halaman : 1 of 1
Page

Parameter Uji <i>Parameters</i>	Hasil Uji <i>Test Result</i>	Satuan <i>Unit</i>	Metode Uji <i>Methods</i>
Polyphenol	580	mg/100g	HPLC
Flavanol	288	mg/100g	HPLC

Cibinong, 11 January 2010



Dr. Yantyati Widyastuti
NIP. 195801121983112001

Universitas Indonesia