

**PENGARUH AGED GARLIC EXTRACT TERHADAP PENINGKATAN
KADAR NITRIC OXIDE DALAM DARAH SUBYEK LAKI-LAKI HIPER-
REAKTOR USIA 20 – 30 TAHUN**

TESIS

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister Ilmu Biomedik (M. Biomed)**

Oleh

KUNI PURWANI

NPM: 0706170873



**UNIVERSITAS INDONESIA
PROGRAM PASCA SARJANA FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK KEKHUSUSAN FISILOGI
JAKARTA
JUNI 2010**

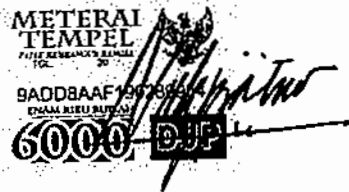
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Kuni Purwani

NPM : 0706170873

Tanda tangan :



Jakarta, 24 Juni 2010

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh

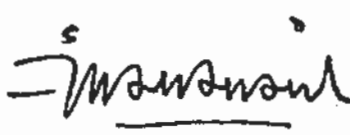
Nama : Kuni Purwani
NPM : 0706170873
Program Studi : Ilmu Biomedik Kekhususan Fisiologi
Judul Tesis : Pengaruh Aged Garlic Extract terhadap Peningkatan Kadar Nitric Oxide dalam Darah Subyek Laki-laki Hiper-Reaktor Usia 20 – 30 Tahun

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : dr. Tomi Hardjatno, MS ()
Pembimbing : Dr. dr. Saptawati Bardosono, MSc. ()
Penguji 1 : dr. Nurhadi Ibrahim, PhD ()
Penguji 2 : dr. Ani Retno Prijanti, MS ()
Penguji 3 : Prof. dr. Fransiscus D. Sujatna, SpFK, PhD ()

Ditetapkan di : Jakarta
Tanggal : Juli 2010
Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik



Dr.rer.physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kehadiran Allah SWT bahwa berkat rahmat dan hidayahNya saya dapat menyelesaikan tesis ini, sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar magister pada Program Studi Ilmu Biomedik Kekhususan Fisiologi, Program Pascasarjana Universitas Indonesia.

Penelitian ini adalah untuk melihat pengaruh aged garlic extract terhadap peningkatan kadar nitric oxide dalam darah subyek laki-laki hiper-reaktor berusia 20 – 30 tahun. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memperkaya pengetahuan tentang *garlic* khususnya *aged garlic extract* yang telah banyak digunakan oleh masyarakat untuk mencegah terjadinya peningkatan tekanan darah. Saya menyadari bahwa pelaksanaan penelitian dan penyusunan tesis ini masih terdapat kekurangan, oleh karena itu masukan dan saran akan sangat berarti agar tulisan ini menjadi lebih baik dan sempurna.

Masa perkuliahan sampai dengan selesainya penulisan tesis ini bukanlah masa yang singkat, selama melalui masa tersebut saya merasakan bahwa banyak pihak yang telah dengan tulus dan ikhlas membantu, memberikan motivasi, dan mendorong semangat saya agar saya dapat menyelesaikan seluruh proses pendidikan ini dengan baik. Pada kesempatan ini dari lubuk hati yang paling dalam saya mengucapkan terimakasih yang tak terhingga kepada:

1. DR.rer.Physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi sebagai Ketua ProgramStudi Ilmu Biomedik.
2. DR. dr. Ermita I. Ilyas, MS. Ketua Departemen Fisiologi FK-UI atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk belajar di bagian Fisiologi FK-UI
3. Dr. Nurhadi Ibrahim, PhD sebagai Ketua Kekhususan Fisiologi yang senantiasa mengingatkan dan mendorong saya untuk segera menyelesaikan pendidikan ini.
4. Dr. Tomi Hardjatno, MS. Sebagai pembimbing pertama yang telah membimbing dengan penuh kesabaran, mengarahkan, dan

mendorong saya dari pembuatan proposal sampai penulisan hasil penelitian sehingga tesis ini dapat diselesaikan.

5. DR. Dr. Saptawati Bardosono, MSc. Sebagai pembimbing kedua yang telah membimbing dengan sabar dan mengarahkan pelaksanaan penelitian sampai dengan penghitungan statistik, sehingga penulisan tesis dapat diselesaikan.
6. Terimakasih kepada Ketua Makmal Terpadu Imunoendokrinologi Prof.dr. Endy M. Moegni, SpOG(K) yang telah memberikan ijin kepada saya untuk menggunakan laboratorium Makmal selama pelaksanaan penelitian. Juga kepada ibu Eva, ibu Sri yang telah membantu selama pelaksanaan penelitian di laboratorium Makmal.

Terimakasih saya sampaikan kepada para dosen di bagian Fisiologi FK-UI atas segala bimbingan dan bantuannya selama saya belajar di bagian Fisiologi. Demikian pula kepada para karyawan bagian Fisiologi terimakasih atas bantuan yang selalu diberikan kepada saya selama saya belajar.

Terimakasih kepada teman-teman Biomedik angkatan 2007 khususnya teman – teman di fisiologi atas kerjasamanya selama mengikuti perkuliahan. Selain itu teman – teman di STIKes Binawan, STIKes As-Syafiiyah, dan Akper Antariksa yang dengan segala ketulusannya selalu memberikan bantuan selama saya kuliah sampai dengan melaksanakan penelitian. Khususnya mahasiswa Akper Antariksa dan mahasiswa STIKes Binawan yang telah membantu untuk bersedia menjadi sampel pada penelitian ini, terimakasih atas kesediaannya.

Yang terakhir tetapi amat sangat berarti bagi saya, anak-anakku Puguh, Tiok, Dera, Budi, dan Nita beserta pasukannya Naswa, Akbar, dan Kinan, kalian adalah semangatku dan terimakasih atas segala pengertian kalian.

Kepada semua pihak yang telah membantu saya dan tidak bisa saya sebutkan satu persatu, tidak ada yang bisa saya berikan selain ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya serta doa semoga semua kebaikan dan bantuan yang diberikan kepada saya mendapat Ridho dari Allah SWT.

Jakarta, Juni 2010

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS
AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

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

Nama : Kuni Purwani
NPM : 0706170873
Program Studi : Magister Ilmu Biomedik
Departemen : Fisiologi
Fakultas : Kedokteran
Jenis Karya : Tesis

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

Pengaruh Aged Garlic Ectract Terhadap Peningkatan Kadar *Nitric Oxide* dalam Darah Subyek Laki-laki Hiper-reaktor Usia 20–30 Tahun.

Dengan hak bebas royalti noneksklusif ini, Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmediakan, mengelola dalam bentuk *database*, merawat dan mempublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta ijin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis dan sebagai pemilik hak cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Dibuat di Jakarta

Pada tanggal: 24 Juni 2010

Yang menyatakan



(Kuni Purwani)

ABSTRAK

Nama : Kuni Purwani
Program Studi : Ilmu Biomedik
Judul Tesis : Pengaruh *Aged Garlic Extract* Terhadap Peningkatan Kadar *Nitric Oxide* dalam darah Subyek Laki-laki Hiper-reaktor usia 20 – 30 tahun.

Latar belakang: *Aged garlic extract* adalah bawang putih yang telah direndam didalam ethanol 15-20% selama 20 bulan pada suhu kamar sehingga zat aktif didalam bawang putih mentah berubah menjadi komponen sulfur yang mudah larut dalam air, yaitu S-allylcysteine (SAC), dan S-allylmercaptocysteine. *Aged garlic extract* dapat meningkatkan produksi *nitric oxide*, karena S-allylcysteine dapat memicu masuknya kalsium kedalam sel endotel, selanjutnya merangsang *endothelial nitric oxide synthase* memproduksi *nitric oxide*. *Nitric oxide* yang telah dibentuk akan segera berdifusi kedalam sel otot polos yang berdekatan serta mengaktifkan beberapa mekanisme yang akan menyebabkan otot polos relaksasi dan tonus pembuluh darah menurun. *Cold Pressor Test* adalah suatu standar tes untuk memprediksi orang yang normotensi kelak akan mengidap hipertensi jika hasil tesnya masuk kedalam kategori hiper-reaktor, karena orang hiper-reaktor terjadi hipersesitivitas pada sistem saraf simpatisnya dan gangguan pada pembentukan *nitric oxide* sebagai vasodilator di pembuluh darah. Bila *aged garlic extract* dapat meningkatkan kadar *nitric oxide* maka tonus pembuluh darah pada orang hiper-reaktor dapat dijaga agar tidak meningkat ketika terjadi vasokonstriksi

Tujuan: Mengetahui efek *aged garlic extract* pada proses peningkatan kadar *nitric oxide* dalam darah subyek laki-laki hiper reaktor usia 20-30 tahun

Metode: Mendapatkan sampel hiper-reaktor dengan melakukan uji *cold pressor test* pada subyek laki-laki yang berumur 20 – 30 tahun. 10 Subyek diberi *aged garlic extract* 1200 mg per oral, 10 subyek diberi plasebo, kemudian dilakukan pemeriksaan kadar *nitric oxide* sebelum perlakuan, sesudah 60' perlakuan dan 90' perlakuan menggunakan *Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay* yang dikeluarkan oleh *Cayman Chemical Company*.

Hasil: Kadar *nitric oxide* sesudah pemberian *aged garlic extract* terlihat lebih tinggi daripada sebelumnya, namun secara statistik tidak berbeda bermakna ($p > 0,05$). Demikian juga nilai *nitric oxide* sebelum dan sesudah perlakuan pada masing-masing kelompok antara dua kelompok, tidak berbeda bermakna untuk $\Delta 60'$ ($p > 0,05$) dan $\Delta 90'$ ($p > 0,05$). Selanjutnya dilakukan uji untuk melihat apakah nilai *nitric oxide* dari waktu ke waktu tersebut berbeda antara kelompok perlakuan dengan kelompok plasebo, didapatkan hasil ($p > 0,05$), dan nilai *nitric oxide* dari waktu ke waktu tersebut tidak ada kaitannya dengan beda perlakuan ($p > 0,05$).

Kesimpulan: Sediaan *aged garlic extract* sebanyak 1200 mg yang diberikan per oral kepada manusia cenderung meningkatkan kadar *nitric oxide*, namun secara statistik tidak berbeda bermakna.

Kata kunci: *aged garlic extract*, *nitric oxide*, hiper-reaktor

ABSTRACT

Name : Kuni Purwani
Study program : Master Program of Biomedical Science
Title : The effect of Aged Garlic Extract to the increase level of Nitric Oxide within blood of hyper-reactor men subject aged between 20-30 years.

Introduction: *Aged garlic extract* derives from garlic that has been remained in 15-20% ethanol for 20 months at room temperature so that the active substance in garlic changes into sulfur component that is water-soluble, S-allylcysteine (SAC), and S-allylmercaptocysteine. *Aged garlic extract* increase the production of Nitric Oxide (NO), this is happen because SAC stimulate the entry of calcium into endothelial cell, furthermore stimulate endothelial nitric oxide synthase to produce NO. Nitric Oxide that has been formed diffuses immediately into neighboring smooth muscle and activates several mechanisms that cause smooth muscle relaxation and decrease vascular tone. *Cold Pressure Test* is a standard test to predict whether a person with normotension is at risk to become hypertension if the test results fallen into hyper-reactor category. Hyper-reactor people have sympathetic nerves hypersensitivity and alteration in the production of NO as vasodilator. If *Aged garlic extract* is able to increase NO level, then vascular tone in a hyper-reactor person can be maintained not to increase when vasoconstriction occur.

Objective: Knowing the effects of *aged garlic extract* to the increase level of Nitric Oxide within blood of hyper-reactor men aged between 20 -30 years.

Method: Acquiring the sample by performing cold pressure test to men subject aged between 20-30 years old. Ten subjects were given 1200 mg of aged garlic extract per oral and ten other subjects were given the placebo. Then, an examination been done to check the value of NO level before treatment, 60' after treatment, and 90' after treatment using *Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay* produced by *Cayman Chemical Company*.

Result: The value of nitric oxide (NO) level after aged garlic extract were given is higher than before, but statistically does not shown significant difference ($p > 0.05$). Both does the value of NO level before and after treatment in each group, between two groups shows no significant difference at $\Delta 60'$ ($p > 0.05$) and $\Delta 90'$ ($p > 0.05$). Furthermore, a test been done to observe whether the value of NO level from time to time were different between the treatment and the placebo group, the result is $p > 0.05$. In addition, the value of NO level from time to time had nothing to do with the different treatment ($p > 0.05$).

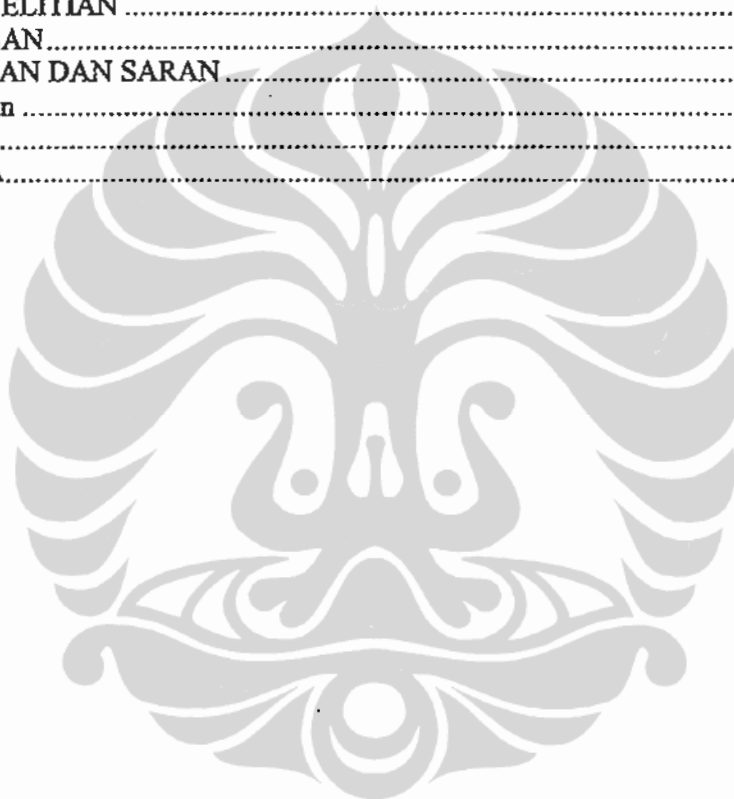
Conclusion: The preparation of 1200 mg aged garlic extract that was given orally to human tends to increase the level of NO, although statistically the increase is not significantly different.

Keywords: *aged garlic extract, nitric oxide, hyper-reactor*

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI.....	vii
ABSTRAK.....	viii
ABSTRACT.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
DAFTAR SINGKATAN.....	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	3
1.3 Hipotesis.....	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	3
1.4.1 Tujuan Umum.....	3
1.4.2 Tujuan Khusus.....	3
1.5 Makna Penelitian.....	4
1.6 Manfaat Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Hipertensi.....	5
2.1.1 Pengaturan Tekanan Darah.....	6
2.1.1.1 Tekanan Darah Arteri.....	7
2.1.1.2 Curah Jantung.....	7
2.1.1.3 Tahanan Perifer.....	8
2.1.2 Gen Yang Mempengaruhi Kelainan Pengaturan Tekanan Darah.....	9
2.1.3 Komplikasi Hipertensi.....	9
2.1.4 Penatalaksanaan Hipertensi.....	10
2.1.5 Beberapa Penelitian Terkait Hipertensi.....	11
2.2 Nitric Oxide.....	12
2.2.1 Sifat Kimiawi <i>Nitric Oxide</i>	12
2.2.2 Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS).....	13
2.2.3 Dinamika pengaturan ekspresi eNOS.....	14
2.2.4 Endotelial Nitric Oxide dan Hipertensi.....	15
2.3 Cold Pressor Test.....	16
2.4 Aged Garlic Extract.....	17
2.4.1 Komponen Kimiawi di Dalam Bawang Putih.....	18
2.4.2 Sediaan Bawang Putih.....	18
2.4.3 Proses Pembuatan Aged Garlic Extract.....	20
2.5 Kerangka Teori Penelitian.....	21
2.6 Kerangka Konsep.....	22
BAB III METODE PENELITIAN.....	23
3.1 Desain Penelitian.....	23
3.2 Populasi dan Sampel.....	23
3.2.1 Populasi.....	23
3.2.2 Sampel.....	23
3.2.3 Rumus Besar Sampel.....	24

3.3	Tempat dan Waktu Penelitian	24
3.4	Etika Penelitian.....	25
3.5	Alat Pengumpulan Data	25
3.5.1	Proses Pembuatan <i>Aged Garlic Extract</i>	26
3.5.2	Pemeriksaan Kadar <i>Nitric Oxide</i> Darah.....	26
3.6	Parameter Penelitian	28
3.7	Pengumpulan Data dan Analisis Statistik	28
3.8	Kerangka Operasional.....	30
3.9	Definisi operasional	31
3.9.1	Subyek hiper - reaktor	31
3.9.2	Nitric Oxide	31
3.9.3	Aged Garlic Extract (AGE)	31
BAB IV HASIL PENELITIAN		32
BAB V PEMBAHASAN.....		36
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN		39
6.1	Kesimpulan	39
6.2	Saran	39
DAFTAR PUSTAKA.....		41



DAFTAR TABEL

Tabel 1 Kadar NO sebelum dan setelah perlakuan dengan AGE.....	34
--	----



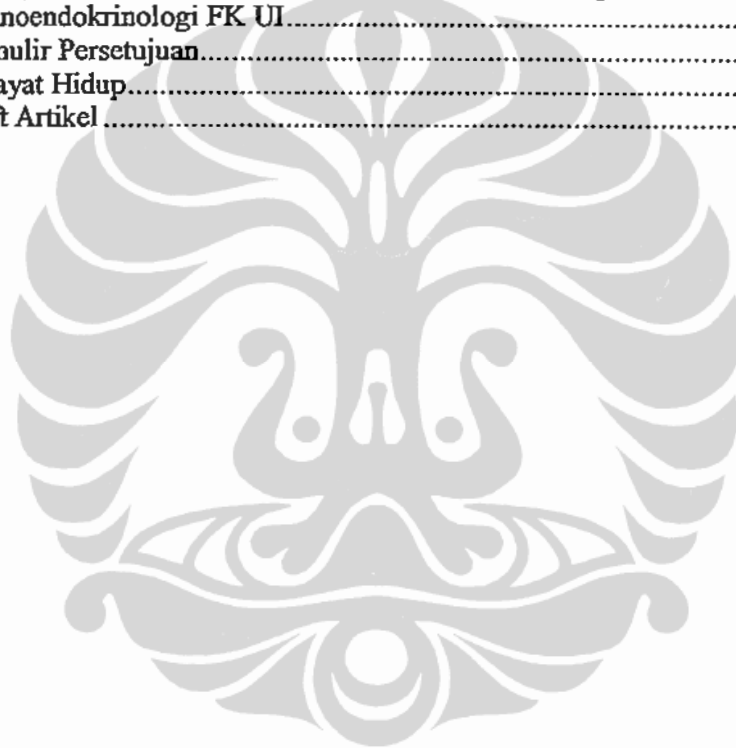
DAFTAR GAMBAR

Gambar 1 Pengaturan Tekanan Darah.....	6
Gambar 2 Isoform Nitric Oxide Synthase	13
Gambar 3 Pengaturan Ekspresi eNOS.....	15
Gambar 4 Terbentuknya Kandungan Sulfur dari Umbi Bawang Putih	20
Gambar 5 Nilai Median Kadar Nitric Oxide Pada Kelompok AGE dan Plasebo Sebelum Perlakuan, 60' dan 90' Sesudah Perlakuan	33
Gambar 6 Pengukuran Berulang Kadar NO Sebelum dan Setelah 60' dan 90' Perlakuan	35



DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN 1 Hasil Pengukuran Tekanan Darah pada Uji CPT	44
LAMPIRAN 2 Hasil Pemeriksaan Kadar Nitric Oxide Prapenelitian	46
LAMPIRAN 3 Hasil Penelitian Peningkatan Kadar Nitric Oxide	47
LAMPIRAN 4 Hasil Pemeriksaan Kadar NO Lengkap Beserta Duplo	48
LAMPIRAN 5 Hasil Pemeriksaan Kadar NO Lengkap Beserta Standar	50
LAMPIRAN 6 Kurva Standar	51
LAMPIRAN 7 Hasil Pemeriksaan Standar μM	52
LAMPIRAN 8 Hasil Pemeriksaan Kadar NO Resmi dari Makmal Terpadu Imunoendokrinologi	53
LAMPIRAN 9 Keterangan Lolos Kaji Etik	54
LAMPIRAN 10 Surat Ijin Melakukan Pemeriksaan NO di Makmal Terpadu Imunoendokrinologi FK UI	55
LAMPIRAN 11 Formulir Persetujuan	56
LAMPIRAN 12 Riwayat Hidup	57
LAMPIRAN 13 Draft Artikel	58



DAFTAR SINGKATAN

AGE	: Aged garlic extract
ADH	: Anti diuretic hormone
ADMA	: Asymetrical dimethylarginine
Cav-1	: Caveoline – 1
CC	: Cardiac contractility
cGMP	: Cyclic guanosine monophosphate
CO	: Cardiac output
CPT	: Cold pressor test
DADS	: Diallyl disulfide
DBP	: Diastolic blood pressure
DATS	: Diallyl trisulfide
DDAH	: Dimethylarginine dimethylaminohydrolase
EDRF	: Endothelial derived relaxing factors
eNOS	: Endothelial nitric oxide synthase
FAD	: Flavin adenine dinucleotida
FMN	: Flavin mononucleotide
GTP	: Guanosine triphosphate
H ₄ B	: Tetrahydrobiopterin
HR	: Heart rate
Hsp90	: Heat shock protein 90
iNOS	: Inducible nitric oxide synthase
LDL	: Low density lipoprotein
NADPH	: Nicotinamide adenine dinucleotida phosphate
nNOS	: Neuronal nitric oxide synthase
NO	: Nitric oxide
NP	: Natriuretic peptide
OSC	: Organosulfur compounds
PKG	: Protein Kinase G
PSNS	: Parasympathetic nervous system
Riskesdas	: Riset kesehatan dasar
SAC	: S-allyl cysteine
SAMC	: S-allylmercapto cysteine
SBP	: Systolic blood pressure
sGC	: Soluble guanylyl cyclase
SNS	: Sympathetic nervous System
SKRT	: Sensus kesehatan rumah tangga
SV	: Stroke volume
VR	: Venous return
WHO	: World Health Organization

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit kardiovaskular adalah penyakit yang kompleks dan multifaktorial dengan berbagai faktor penyebabnya. Kerusakan dinding pembuluh darah, hiperlipidemia, dan hipertensi mempunyai korelasi positif terhadap terjadinya gangguan kardiovaskular, dan faktor risiko utama pada gangguan kardiovaskular adalah hipertensi (Sensus Kesehatan Rumah Tangga (SKRT), 2001) Hipertensi kini menjadi masalah global karena prevalensi yang terus meningkat sejalan dengan perubahan gaya hidup seperti merokok, obesitas, inaktivitas fisik, dan stres psikososial. Hampir di setiap negara, hipertensi menduduki peringkat pertama sebagai penyakit yang paling sering dijumpai.

Data WHO tahun 2000 menunjukkan, di seluruh dunia, sekitar 972 juta orang atau 26,4% penghuni bumi mengidap hipertensi dengan perbandingan 26,6% pria dan 26,1% wanita. Diperkirakan angka ini kemungkinan akan meningkat menjadi 29,2% di tahun 2025. Dari 972 juta pengidap hipertensi, 333 juta berada di negara maju dan 639 juta sisanya berada di negara sedang berkembang, termasuk Indonesia. Menurut hasil Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) tahun 2007, prevalensi hipertensi di Indonesia sementara mencapai 31,7 persen dari populasi penduduk berusia 18 tahun ke atas. Dari jumlah tersebut, 60 persen di antaranya berakhir menjadi stroke dan sisanya berakhir dengan gangguan jantung, gagal ginjal, dan kebutaan. Data penelitian Departemen Kesehatan RI menunjukkan hipertensi dan penyakit kardiovaskular cenderung meningkat seiring dengan gaya hidup yang jauh dari perilaku hidup sehat selain itu mahalnya biaya pengobatan hipertensi dan kurangnya sarana dan prasarana penanggulangan hipertensi. Pemaparan hipertensi dengan penyebab yang tidak diketahui atau *essential hypertension* merupakan 90% dari kasus hipertensi. Banyak Faktor yang menjadi penyebab terjadinya hipertensi esensial ini, diantaranya adalah peningkatan aktivitas sistem saraf simpatis dan adanya

defisiensi vasodilator seperti *nitric oxide* (NO) yang kemudian akan memberi dampak pada tonus pembuluh darah.¹

Untuk memprediksi kemungkinan terjadinya penyakit hipertensi pada orang dengan tekanan darah normal, dapat dilakukan pengujian, yang dikenal sebagai *Cold pressor test* (CPT) yang digunakan untuk mengukur respon tekanan darah terhadap stimulus rasa dingin eksternal. CPT telah dikenal lama sebagai pemeriksaan standar untuk mengetahui karakteristik fungsi saraf simpatis, dimana bila hasil uji terjadi peningkatan tekanan darah maka dapat diambil kesimpulan bahwa orang yang bersangkutan mempunyai aktivitas simpatis yang meningkat (*Nakamura, 2008*). Orang yang mempunyai sensitivitas tinggi terhadap sistem saraf simpatis akan mudah terjadi konstiksi pada pembuluh darahnya dan bila pembentukan *nitric oxide* menurun akan berakibat tidak terpeliharanya tonus pembuluh darah, yang lambat laun akan memicu terjadinya hipertensi.^{1,2} Usaha agar vasokonstriksi menetap tidak terjadi, adalah dengan meningkatkan respon vasodilatasi pada pembuluh darah. Agar respon vasodilatasi menjadi lebih efektif, maka perlu dipikirkan bahan yang dapat membantu terjadinya respon vasodilatasi tersebut menjadi lebih efektif.

Garlic atau bawang putih (*allium Sativum*), khususnya sediaan *aged garlic extract* (AGE) dapat memberi efek anti-hyperlipidemia, anti-oxidative dan memberikan perlindungan terhadap kardiovaskular dengan kemampuannya meningkatkan kadar fisiologis *nitric oxide*. *Nitric oxide* yang dikenal pula sebagai *Endothelial Derived Relaxing Factor* (EDRF), merupakan vasodilator kuat, diproduksi didalam lapisan endotel dan pembentukannya tergantung kepada jumlah kalsium didalam sel endotel.^{1,2,3} Pada penelitian yang dilakukan pada hewan percobaan *Male ddY mice* yang diberi AGE (2,86 gr/ kg berat badan) per oral, kemudian diperiksa produksi *nitric oxide* dalam plasma pada 15, 30, dan 60 menit setelah pemberian. Hasil pemeriksaan memperlihatkan kenaikan kadar *nitric oxide* dalam plasma sebanyak 44% pada 15 menit, 37% pada 30 menit dan 44% pada 60 menit.⁴ Pada penelitian terhadap orang dengan tekanan darah sistolik ≥ 140 mmHg, tekanan darah diastolik ≥ 90 mmHg yang diberi *aged garlic extract* 2 kali sehari sebanyak 1200 mg sekali minum selama 12 minggu menunjukkan

penurunan tekanan darah sistolik sebesar 8,38 mmHg dan tekanan darah diastolik sebesar 7,27 mmHg.⁵

Berdasarkan hasil penelitian tersebut, menarik untuk diteliti apakah pemberian *aged garlic extract* sebanyak 1200 mg dapat memberikan efek peningkatan *nitric oxide* setelah 60 menit dan 90 menit pemberian, pada orang yang pada uji *cold pressor test* termasuk kategori hiperreaktor.

1.2 Perumusan Masalah

1. Apakah sediaan *Aged Garlic Extract* (AGE) dapat memberikan efek peningkatan *nitric oxide* (NO) pada orang yang masuk pada kategori hiper-reaktor pada uji *Cold Pressure Test*?
2. Apakah kadar *nitric oxide* darah pada kelompok yang diberi *aged garlic extract* lebih besar peningkatannya dibandingkan dengan kelompok yang diberi plasebo?

1.3 Hipotesis

1. Sediaan AGE sebanyak 1200 mg setelah 60 menit dan 90 menit pemberian akan meningkatkan kadar NO dalam darah pada orang hiper-reaktor.
2. Peningkatan NO pada kelompok yang diberi AGE lebih besar dibanding peningkatannya pada kelompok yang diberi plasebo.

1.4 Tujuan Penelitian

1.4.1 Tujuan Umum

Mengetahui efek *aged garlic extract* (AGE) pada proses peningkatan kadar *nitric oxide* (NO) dalam darah subyek laki-laki hiper reaktor usia 20-30 tahun.

1.4.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui sebaran karakteristik subyek pada 2 kelompok.

2. Mengetahui peningkatan NO pada kelompok plasebo.
3. Mengetahui peningkatan NO pada kelompok yang diberi AGE.

1.5 Makna Penelitian

Mengetahui kadar *nitric oxide* sebelum dan sesudah pemberian *aged garlic extract* (AGE), sebagai dampak adanya peningkatan pembentukan *nitric oxide* oleh *endothelial nitric oxide synthase*.

1.6 Manfaat Penelitian

1. Bagi masyarakat umum dan masyarakat penderita, hasil penelitian ini memberi kemungkinan pencegahan terjadinya hipertensi dengan mengkonsumsi *aged garlic extract*.
2. Bagi institusi pendidikan, hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah perbendaharaan ilmu pengetahuan tentang pengaruh bawang putih khususnya *aged garlic extract* terhadap proses peningkatan kadar *nitric oxide* dalam darah.
3. Bagi para peneliti, hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar untuk penelitian selanjutnya, tentang jalur *aged garlic extract* dalam meningkatkan kadar *nitric oxide* darah. Hal ini perlu diketahui untuk upaya meningkatkan efektifitas *aged garlic extract* ketika menyebabkan meningkatnya kadar *nitric oxide*.
4. Bagi pemerintah, hasil penelitian ini dapat digunakan untuk mengembangkan teknologi pembuatan *aged garlic extract* dengan harga yang murah, sehingga dapat terjangkau oleh seluruh lapisan masyarakat.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

Pada tinjauan teori ini akan dibahas teori-teori yang melandasi penelitian. Dalam hal ini peneliti ingin menjelaskan bila *aged garlic extract* dapat meningkatkan kadar *nitric oxide* maka tonus pembuluh arteri dapat dijaga agar tidak meningkat ketika terjadi vasokonstriksi pada orang dengan kategori hiper-reaktor pada uji *Cold Pressor Test* (CPT). Pada beberapa penelitian, orang dengan kategori hiper-reaktor pada uji CPT adalah orang yang dapat diprediksi kelak akan mengidap hipertensi karena adanya hipersensitivitas pada sistem saraf simpatis dan gangguan pada pembentukan *nitric oxide* sebagai vasodilator di pembuluh darah.^{2,13,23,24} Dengan demikian peneliti akan membahas teori-teori tentang: Hipertensi; Uji CPT; *Nitric Oxide*; dan *Aged Garlic Extract*.

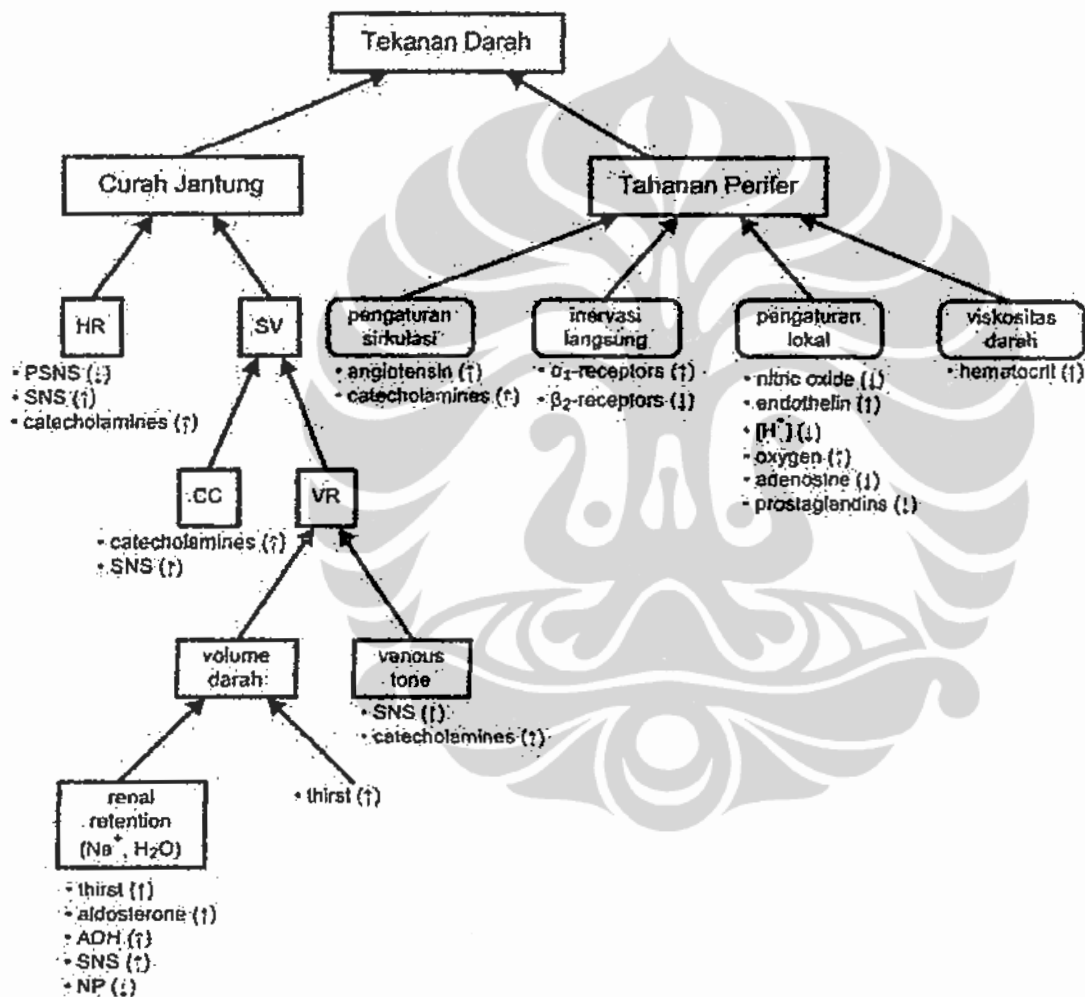
2.1 Hipertensi

Hipertensi dapat dijelaskan sebagai suatu keadaan terjadinya peningkatan secara konsisten dari tekanan darah arteri sistemik. Menurut *World Health Organization (WHO)* individu yang didiagnosa hipertensi adalah apabila pada pengukuran tekanan darah diastoliknyanya sebesar 90 mmHg atau lebih dan/atau tekanan darah sistoliknyanya sebesar 140 mmHg atau lebih. Kategori hipertensi dibagi dalam beberapa *stage* tergantung kenaikan tekanan darah baik sistolik maupun diastolik, kategori tersebut adalah *prehypertesion* (SBP 120-139 mmHg atau DBP 80-89 mmHg), *stage 1 hypertension* (SBP 140-159 mmHg atau DBP 90-99 mmHg), dan *stage 2 hypertension* (SBP \geq 160 mmHg atau DBP \geq 100 mmHg). (JAMA 2003) Kenaikan tekanan darah pada individu yang terpapar dengan hipertensi, bisa kombinasi antara kenaikan tekanan darah sistolik dan diastolik atau hanya tekanan sistolik saja tanpa kenaikan tekanan diastolik (disebut dengan *Isolated Systolic Hypertension*).^{6,7} Pada kebanyakan kasus terjadinya kenaikan tekanan darah sistolik maupun kenaikan tekanan darah diastolik tidak diketahui penyebabnya, disebut dengan hipertensi primer

(esensial), dan merupakan 90% - 95% dari seluruh kasus hipertensi, sisanya adalah hipertensi sekunder yang diketahui jelas penyebabnya.^{6,11}

Hypertensi esensial merupakan hasil dari suatu interaksi yang rumit dan saling mempengaruhi antara faktor genetik dan faktor lingkungan neurohumoral *host* sampai berakhir dengan terjadinya kenaikan tekanan darah.^{6,7,8}

2.1.1 Pengaturan Tekanan Darah



Gambar 1 Pengaturan Tekanan Darah

(Sumber: Pathophysiology Heart Disease, editor Leonard S. Lilly)

Keterangan gambar: tanda panah(↑) berarti merangsang, (↓) berarti menghambat parameter yang ada didalam kotak. ADH, antidiuretik hormone; CC, cardiac contractility; HR, heart rate; NP, natriuretic peptide; PSNS, parasympathetic nervous system; SNS, sympathetic nervous system; SV, stroke volume; VR, venous return

2.1.1.1 Tekanan Darah Arteri

Faktor utama yang mempengaruhi hemodinamika adalah pengaturan tekanan darah atau tekanan arterial, dimana tekanan darah menggambarkan tenaga yang diperlukan untuk mendorong darah ke dalam sistem pembuluh arteri sampai ke pembuluh kapiler. Tenaga tersebut ditimbulkan oleh kuatnya jantung berdenyut yang merupakan refleksi dari tekanan ventrikel. Tekanan darah arterial sifatnya adalah *steady* dan pulsatil, yang pulsatil adalah tekanan nadi mengikuti irama kerja jantung selama siklus jantung yang terbagi menjadi periode sistolik dan diastolik. Nilai tekanan nadi adalah selisih antara tekanan sistolik dengan diastolik. Tekanan nadi mengalami penurunan sepanjang arteriol dan besarnya penurunan tekanan bervariasi tergantung apakah pembuluh berkontraksi atau berdilatasi. Yang sifatnya *steady* adalah *mean arterial pressure* dan cenderung konstan sepanjang pohon arteri. Oleh karena durasi periode diastolik lebih panjang daripada periode sistolik maka untuk mengetahui nilai tekanan arterial rata-rata (*mean arterial pressure*) adalah dengan menghitung nilai tekanan diastolik ditambah dengan sepertiga dari pengurangan nilai tekanan sistolik dan diastolik.^{9,10,11,12}

2.1.1.2 Curah Jantung

Seperti dijelaskan diatas bahwa tekanan darah adalah refleksi tekanan ventrikel untuk mendorong sejumlah darah ke dalam aorta dan darah yang mengalir didalam arteri akan dipengaruhi oleh tahanan yang ditimbulkan oleh dinding pembuluh darah tersebut, maka dapat dikatakan bahwa tekanan darah adalah produk dari curah jantung dan tahanan perifer total, yang dipengaruhi oleh kondisi yang mempengaruhi salah satu atau kedua faktor tersebut. Curah jantung merupakan produk dari volume sekuncup dan kecepatan denyut jantung (lihat gambar 1).

Kecepatan denyut jantung terutama diatur oleh persarafan jantung, stimulasi simpatis akan meningkatkan kecepatan dan stimulasi parasimpatis akan menurunkan kecepatan, selain itu jumlah katekolamin yang beredar di sirkulasi juga dapat mempengaruhi kecepatan denyut jantung. Curah jantung merupakan jumlah darah yang dikeluarkan oleh jantung per satuan waktu. Curah jantung

dapat berubah-ubah sebagai akibat dari terjadinya perubahan baik pada kecepatan denyut maupun volume sekuncup.^{9,10} Volume sekuncup ditentukan oleh kekuatan kontraktilitas otot jantung, aliran balik vena ke dalam jantung (preload), dan regangan di ventrikel kiri agar darah dapat dialirkan ke dalam aorta dengan melawan resistensi (afterload). Kekuatan kontraktilitas miokardium (efek inotropik) diatur oleh persarafan, rangsang simpatis dengan melepas norepinefrin menyebabkan serat-serat otot miokardium berkontraksi lebih kuat sedangkan rangsang parasimpatis menimbulkan efek sebaliknya, efek inotropik positif norepinefrin yang dibebaskan dari ujung-ujung saraf diperkuat oleh katekolamin di sirkulasi. Aliran balik vena (*venous return*) dipengaruhi oleh volume darah dan tonus pembuluh vena, (lihat gambar 1) pengaturan yang terkait volume darah adalah kemampuan ginjal untuk meretensi natrium yang kemudian akan diikuti oleh retensi air melalui dikeluarkannya aldosteron, anti diuretik hormon, mekanisme rasa haus dan inisiasi dari sistem saraf simpatis sehingga volume darah menjadi meningkat, dilepasnya peptida natriuretik akan menyebabkan ginjal tidak meretensi natrium dan air sebagai akibatnya volume darah menjadi berkurang.^{9,10,11,12}

2.1.1.3 Tahanan Perifer

Tahanan perifer ditentukan terutama oleh diameter pembuluh darah dan kemudian kekentalan darah (lihat gambar 1). Plasma mempunyai kekentalan 1,8 kali lebih kental dibanding air sedangkan darah lengkap 3 – 4 kali lebih kental dibanding air, jadi viskositas bergantung sebagian besar pada kadar hematokrit yaitu persentase volume darah yang diduduki oleh sel darah merah.^{11,12} Diameter pembuluh darah diatur dengan melakukan vasokonstriksi dan vasodilatasi dipengaruhi oleh beberapa mekanisme pengaturan yaitu pengaturan lokal di pembuluh darah, pengaturan sirkulasi umum, inervasi langsung terhadap pembuluh darah (lihat gambar 1). Pengaturan lokal di pembuluh arteri dan arteriol dipengaruhi oleh respon *myogenic*, dengan karakteristik apabila terjadi peningkatan tekanan transmural akan terjadi konstriksi dan akan terjadi dilatasi setelah tekanan transmural menurun. Pengaturan lokal pembuluh darah arteri dan arteriol oleh respon *myogenic* dipengaruhi oleh *nitric oxide*, endotelin, kadar H⁺,

kadar oksigen, adenosin, dan prostaglandin. Pada pengaturan sirkulasi umum, yang mempengaruhi adalah peningkatan sirkulasi angiotensin II, dan peningkatan katekolamin. Pengaturan yang terakhir adalah inervasi langsung ke pembuluh darah dengan melibatkan reseptor α_1 dan β_2 .¹¹

Dengan demikian, paling tidak ada empat sistem yang bertanggung jawab untuk mengatur tekanan darah, yaitu jantung yang menyediakan tekanan untuk memompa, tonus pembuluh darah yang menentukan tahanan sistemik, ginjal yang mengatur volume darah, dan hormon serta sistem saraf yang mengatur fungsi ketiga sistem tersebut.⁷

2.1.2 Gen Yang Mempengaruhi Kelainan Pengaturan Tekanan Darah

Kelainan pada pengaturan tekanan darah ini berkaitan dengan pengaturan gen yang berbeda dari normal.⁷ Gen yang terkait adalah gen yang berhubungan dengan sistem renin-angiotensin-aldosteron, termasuk angiotensin II reseptor, angiotensinogen dan renin, gen yang terkait dengan pengaturan tonus pembuluh darah seperti *endothelial nitric oxide synthase*, G reseptor kinase, adrenergic reseptor dan sistem transport kalsium. Selain itu gen untuk *sodium-hydrogen antiporter*, dan beberapa gen yang mempengaruhi sensitivitas terhadap garam, terakhir adalah gen yang menyebabkan resistensi insulin, obesitas, dan *dyslipidemia*.⁶

2.1.3 Komplikasi Hipertensi

Apapun penyebab kenaikan tekanan darah, akibat dari peningkatan tekanan darah yang kronik terhadap organ-organ lain adalah sama. Kenaikan tekanan darah secara umum tidak memberikan tanda-anda yang jelas tetapi dapat memberikan efek merusak pada beberapa organ terutama pembuluh darah, jantung, otak, ginjal dan retina. Organ yang menjadi target komplikasi tersebut tergantung kepada seberapa berat dan berapa lama kenaikan tekanan darah secara kronik telah terjadi. Kenaikan tekanan darah akan mengakibatkan secara langsung peningkatan kerja jantung dan kerusakan pembuluh darah arteri akibat dari efek peningkatan tekanan darah itu sendiri serta terjadinya percepatan proses

atherosklerosis. Peningkatan tekanan pada pembuluh darah akan menyebabkan struktur pembuluh darah menjadi abnormal karena otot polos pembuluh darah akan menjadi hipertrofi, disfungsi sel endotel, dan kelemahan dari serat elastik. Pembuluh arteri yang dengan plak aterosklerosis dapat membentuk trombus atau menimbulkan emboli kolesterol yang dapat menyumbat pembuluh bagian distal dan menyebabkan infark pada organ tersebut, misalnya penyumbatan pada pembuluh darah di otak akan menyebabkan stroke, di jantung menyebabkan infark miokardial. Aterosklerosis pada arteri besar akan menurunkan elastisitas pembuluh tersebut, ketika mendapat tekanan yang tinggi pada saat sistolik dapat berakibat trauma pada endotel dan menyebabkan ruptur aneurisma. Beberapa organ yang menjadi target kerusakan oleh karena hipertensi kronik adalah, jantung, sistem serebrovaskular, aorta dan sistem pembuluh perifer, ginjal dan retina. Ketika hipertensi tidak diobati, maka 50% akan meninggal karena kelainan pada arteri koronaria dan penyakit jantung kongesti, 33% karena stroke, dan 17 % karena gagal ginjal.^{6,7}

2.1.4 Penatalaksanaan Hipertensi

Pengobatan pada hipertensi dapat dilakukan menggunakan dua pendekatan yaitu, nonfarmakologi dan farmakologi. Pengobatan nonfarmakologi termasuk, penurunan berat badan bagi orang yang mempunyai berat badan lebih 10% dari berat badan normal, meningkatkan eksersais dengan olah raga, diet, pengurangan asupan garam, asupan makanan tinggi kalium, kalsium dan magnesium berhenti konsumsi alkohol, berhenti merokok.

Pengobatan farmakologi diindikasikan bila pengobatan nonfarmakologi memberikan hasil yang tidak adekuat. Obat-obatan yang digunakan untuk mengobati hipertensi dapat dibagi kedalam empat kategori yaitu diuretika, simpatolitik, vasodilator, dan obat-obatan yang dapat mempengaruhi sistem renin-angiotensin-aldosteron. Diuretik dapat menurunkan volume sirkulasi, curah jantung, dan *mean arterial pressure*. Diberikan pada orang dengan hipertensi yang fungsi ginjalnya normal.^{7,11} *Sympatholytic agents* termasuk β -blockers, central α_2 -adrenergic agonists, systemic α -adrenergic-blockers. Vasodilator, seperti *calcium channel blockers* yang akan mengurangi *influx* Ca^{++} ,

dimana *influx* kalsium tersebut akan mempengaruhi jantung dan otot pembuluh darah berkontraksi, jadi akan menurunkan kontraktilitas jantung dan tahanan perifer total. Obat-obatan yang dapat mempengaruhi sistem renin –angiotensin, seperti *angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors*, *angiotensin II receptor blockers*. ACE inhibitors menurunkan tekanan darah dengan menghambat perubahan angiotensin I menjadi angiotensin II sehingga menurunkan aktivitas vasopressor dari angiotensin II dan sekresi aldosteron, kemudian akan menurunkan tahanan perifer total dan retensi sodium oleh ginjal. Sebagai tambahan, efek antihipertensi dari ACE inhibitors adalah meningkatkan konsentrasi vasodilator bradikinin didalam sirkulasi. Kerja *angiotensin II receptors blockers* adalah dengan memblok ikatan angiotensin II dengan reseptornya di pembuluh darah, dan kelenjar adrenal dengan menghambat efek angiotensin II, oleh karena itu akan menyebabkan vasodilatasi dan penurunan sekresi aldosteron sehingga tekanan darah menurun.^{6,7,11}

2.1.5 Beberapa Penelitian Terkait Hipertensi

Hasil dari beberapa penelitian menyatakan bahwa orang dengan hipertensi terbukti terjadi peningkatan aktivitas simpatis, terlihat dengan meningkatnya kadar norepinefrin. Hal tersebut mengindikasikan adanya aktivitas yang berlebihan dari sistem saraf simpatis. Selain itu juga terjadi kerusakan pada fungsi endotelial, dimana produksi *nitric oxide* sebagai vasodilator kuat menjadi menurun.^{8,14} Untuk melihat karakteristik fungsi saraf simpatis pada orang normotensi tersedia sebuah standar test yang dikenal dengan *cold pressor test (CPT)*, dengan mengukur respon tekanan darah pada orang yang diuji dapat diprediksi apakah orang tersebut merupakan risiko tinggi untuk terjadinya hipertensi dikemudian hari.¹³ Jika melihat bahwa pengaturan tekanan darah normal mengikut sertakan banyak sistem beserta faktor-faktor yang mempengaruhi pengaturan dari masing-masing sistem, beberapa penelitian menyatakan bahwa perkembangan terjadinya hipertensi esensial adalah hasil interaksi dari adanya kelainan (*defects*) pengaturan tekanan darah dengan stressor yang diciptakan oleh lingkungan neurohumoral.²

2.2 Nitric Oxide

Nitric oxide (NO) merupakan molekul pembawa pesan yang penting dalam sel dan antar sel, dan bersifat serba guna dalam menjalankan perannya pada proses fisiologi di dinding pembuluh darah sebagai *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF).^{14,15,16} Disintesis dari L-arginine oleh *NO synthase* (NOS). Terdapat tiga macam NOS yaitu *endothelial constitutive NOS* (eNOS), *inducible NOS* (iNOS) yg dibentuk bila ada rangsang dari beberapa *cytokines*, dan *neuronal constitutive NOS* (nNOS) (lihat gambar 2) yang dianggap bertanggung jawab terhadap biosintesis NO di sel-sel tersebut. NO yang dihasilkan dari eNOS dan nNOS dilaporkan mengatur tonus vasomotor, menghambat platelet atau leukosit agregasi dan adhesi ke endothelium, dan sebagai komponen *anti-atherogenicity*.^{14,15,16,17}

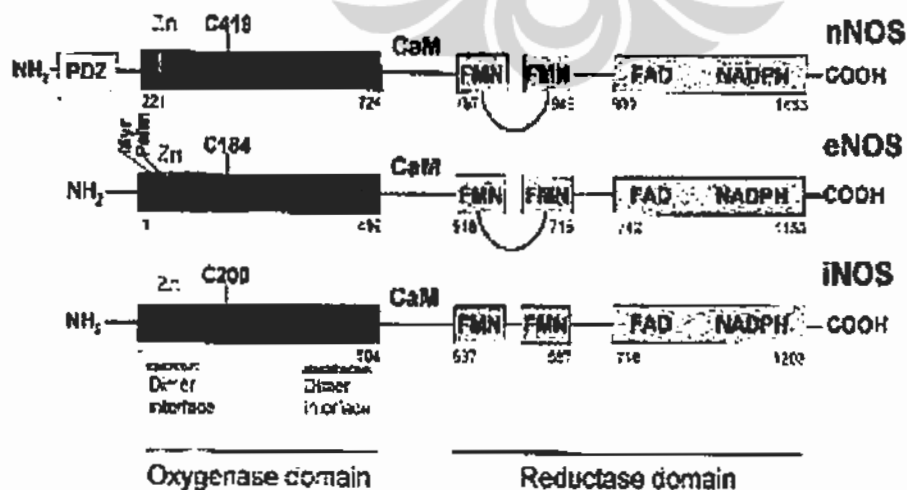
2.2.1 Sifat Kimiawi Nitric Oxide

Struktur kimiawi *nitric oxide* yang spesifik menjadikan molekul *nitric oxide* sebagai *intercellular messenger*. Sebagai molekul gas lipofilik yang kecil (30-Da), NO mudah melewati membran sel dan dinding pembuluh darah. Waktu paruhnya pendek yaitu 5-10 detik, oleh karena itu efeknya cepat dan lokal. Kemampuan membentuk *nitric oxide* oleh *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS) berperan dalam memelihara homeostasis tonus pembuluh darah, dapat diatur oleh sinyal ekstraselular terutama *shear stress* untuk memodifikasi eNOS.^{18,21} *Nitric oxide* yang dibentuk oleh eNOS di sel endotel pembuluh darah dengan cepat akan berdifusi kedalam lapisan otot polos kemudian akan berikatan dengan *soluble guanylate cyclase* (sGC) dan juga kedalam lumen pembuluh darah dimana *nitric oxide* akan berinteraksi dengan platelet. Konsentrasi *nitric oxide* dalam jumlah nanomolar dapat mengaktifkan 100 kali lipat kemampuan *guanylate cyclase* untuk mengubah *guanosine triphosphate* (GTP) ke *cyclic guanosine monophosphate* (cGMP).^{15,21} Target utama cGMP di dinding pembuluh darah adalah pembentukan *cGMP-dependent protein kinase*, yang akan mengaktifkan *myosin light chain phosphatase* enzim ini menyebabkan defosforilasi *myosin light chain* ketika *myosin light chain kinase* inaktif. Selain itu cGMP menghambat masuknya Ca^{++} ke dalam sel otot polos, yang menyebabkan

jumlah kalsium di otot polos menjadi menurun. Bila Ca^{++} jumlahnya menjadi sedikit, maka kalsium tidak akan berikatan dengan *calmodulin*. Tanpa berikatannya Ca^{++} dengan *calmodulin*, *myosin light chain* kinase menjadi inaktif yang berlanjut dengan defosforilasi *myosin light chain* dan otot polos pembuluh darah menjadi relaksasi.^{2,19}

2.2.2 Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS)

eNOS adalah *isoform nitric oxide synthase* yang berada di membran sel endotel pembuluh darah yang memproduksi *nitric oxide* dari asam amino L-arginin. eNOS adalah enzim yang homodimerik yang bermuatan satu *N-terminal heme-binding domain* dan satu *C-terminal reductase domain*, dipisahkan oleh *calmodulin-binding domain*. *N-terminal domain* juga dikenal sebagai *oxygenase domain*, yang merupakan tempat berikatannya protoporphyrin IX, tetrahydrobiopterin (H_4B), dan substrat L-arginine (lihat gambar 2). *C-terminal flavoprotein reductase domain* secara struktural homolog dengan cytochrome P-450 reductase dan mengikat flavin adenin dinucleotida (FAD), flavin mononucleotida (FMN), dan nicotinamide adenine dinucleotida phosphate (NADPH).^{1,15,20,21} eNOS berikatan dengan membrane plasma dilokasi yang spesifik dimana membrane membentuk invaginasi kecil, dikenal sebagai *caveolae*.^{16,22}



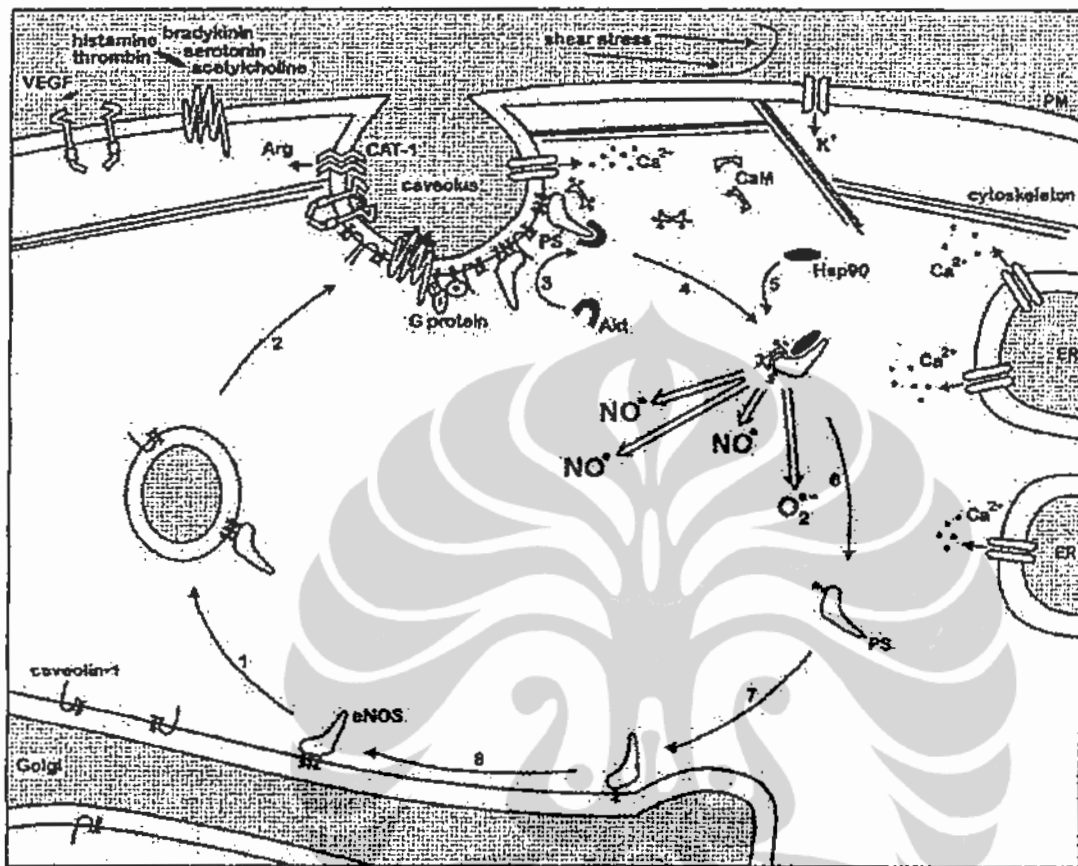
Gambar 2 Isoform Nitric Oxide Synthase
(diambil dari www.biochemj.org/bj/387/059/bj3570593.htm)

2.2.3 Dinamika pengaturan ekspresi eNOS

Pengaturan ekspresi eNOS tidak hanya membutuhkan substrat dan *co factor* akan tetapi melibatkan banyak mekanisme kontrol yang saling terkait antara satu mekanisme dengan mekanisme yang lain, serta *signaling pathway* sebelum enzim tersebut dapat melaksanakan fungsinya.

Siklus protein eNOS diawali dengan *cotranslation myristoylation* yang diikuti proses *palmitoylation*,^{1,16,20} dimana kedua proses ini akan menentukan bahwa eNOS akan terikat di aparat Golgi, kemudian akan pindah ke caveolae di plasma membran bersama dengan caveolin-1 melalui *vesicle*. (lihat gambar 3 siklus 1 dan 2). Di membran caveolae eNOS berikatan dengan caveolin-1, yang akan menghambat aktivitas eNOS, sehingga eNOS berada dalam keadaan inaktif. Diperkirakan keberadaan eNOS di caveolae mempunyai arti penting yaitu eNOS menjadi sangat dekat dengan faktor-faktor yang diperlukan seperti arginine, kalsium, dan kofaktor BH₄, dan menjadi efisien bila mendapat stimulus dari *shear stress* dan agonis. Ketika sel endothel mendapatkan *shear stress* maka sinyal *shear stress* akan diteruskan melalui *potassium channel*,^{3,20} dan *cytoskeleton* yang akan memicu terjadinya fosforilasi tyrosine dari protein spesifik,^{21,22} aktivasi phosphatidylinositol 3-kinase yang berlanjut dengan aktivasi Akt kinase. Teraktivasinya Akt akan mulai mengaktifkan eNOS dengan melakukan fosforilasi pada serine yang akan meningkatkan afinitas enos ke calmodulin (gambar 3, siklus 3). Sesudah agonis berikatan dengan plasma membran, akan mengaktifkan G protein yang kemudian akan mengaktifkan *calcium channels* di retikulum endoplasmik melalui fosfolipase C dan inositol- trifosfat. Meningkatnya kalsium di intraselular memperkuat ikatan calmodulin ke eNOS dan melepas ikatan eNOS dengan caveolin-1. pada waktu yang bersamaan di eNOS terjadi proses *depalmitoylation* dan berlanjut dengan translokasi eNOS ke sitosol (gambar 3 siklus 4). Dalam keadaan berikatan dengan *calcium – calmodulin complex*, eNOS membentuk *nitric oxide*. Pembentukan *nitric oxide* akan ditingkatkan dengan berinteraksi dengan *Heat Shock Protein 90* (Hsp90) yang ada di sitosol (gambar 3 siklus 5). eNOS di inaktivasi oleh proses fosforilasi yang kemudian melepas ikatan dengan kalmodulin(gambar 3 siklus 6). eNOS akan

translokasi ke golgi (gambar 3 siklus 7 dan 8) dan mengalami proses *palmitoylation* kembali agar dapat di transpor ke membran caveolae.²⁰



Gambar 3 Pengaturan Ekspresi eNOS
(sumber: Govers R. 2001)

2.2.4 Endotelial Nitric Oxide dan Hipertensi

Nitric oxide yang dibentuk di sel endotel sebagai vasodilator yang kuat berperan dalam menjaga tekanan darah agar selalu di dalam batas normal, oleh karena itu bila terjadi gangguan pada pembentukan *nitric oxide* akan mempengaruhi tekanan darah.⁸ Pembuluh darah harus berespon cepat terhadap setiap stimulus eksternal terutama melakukan perubahan fisik berkaitan dengan modifikasi *shear stress*. Sel endotelial adalah bagian dari pembuluh darah yang terutama terpapar dengan kekuatan *shear stress*, selanjutnya pembuluh darah akan beradaptasi dengan mengatur diameter pembuluh darahnya.^{18,21}

Kerusakan pada pembentukan *nitric oxide* (NO) akan memberi dampak pada terjadinya peningkatan tonus pembuluh darah,^{1,2} dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor yang terkait dengan regulasi pembentukan *nitric oxide* itu sendiri. Sintesis NO tergantung kepada tersedianya L- arginine, dimana sintesis tersebut dapat di blok oleh *asymetrical dimethylarginine* (ADMA) yg berada di plasma. Bila kadar ADMA meningkat secara signifikan maka NO tidak akan dibentuk. Kadar ADMA diatur melalui proses yg dinamis, di sintesis melalui *methylation* dari arginin yang berada didalam protein dilepas melalui *proteolysis* dan dimetabolisme menjadi sitrulin oleh enzim dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) – 1 dan 2, mutasi pada DDAH- 1 menyebabkan terjadinya hipertensi.^{1,16}

2.3 Cold Pressor Test

Cold Pressor Test (CPT) adalah suatu standar tes yang dilakukan untuk mengevaluasi karakteristik fungsi sistem saraf simpatis, selain itu dapat digunakan untuk memprediksi risiko hipertensi pada orang dengan normo-tensi sebelum dilakukan uji, dengan melihat respon tekanan darah ketika diberikan stimulus rasa dingin di salah satu anggota tubuh.²³

Deskripsi dari pelaksanaan CPT adalah dengan merendam telapak tangan sampai dengan pergelangan subyek dengan air es yang bersuhu antara 0,5°C - 4°C selama 1 menit. Sebelum merendam telapak tangan, subyek diminta untuk berbaring tenang selama 20 menit kemudian dilakukan pemeriksaan tekanan darah sebanyak tiga kali berturut-turut dengan *sphygmomanometer standard mercury*. Kemudian subyek diminta untuk merendam telapak tangan sampai pergelangan tangan pada tangan yang tidak terpasang *cuff sphygmomanometer*. Setelah 30 detik perendaman dilakukan pemeriksaan tekanan darah, demikian juga pada detik ke 60 perendaman dilakukan pemeriksaan tekanan darah. Satu jam sebelum uji subyek diminta untuk tidak merokok, minum kopi atau teh, minum alkohol dan melakukan aktivitas yang berlebih.¹³

Hasil dari uji CPT adalah normo-reaktor, yaitu subyek yang pada hasil pengukuran tekanan darah setelah direndam air es tidak terjadi peningkatan atau

meningkat dibawah 15 mmHg baik tekanan darah sistolik ataupun diastolik, sedangkan kategori hiper-reaktor adalah orang yang setelah uji CPT mempunyai kenaikan tekanan darah sistolik ataupun diastolik sebesar ≥ 15 mmHg.¹³ Uji CPT menyebabkan aktivasi sistem saraf simpatis secara global dengan ditandai oleh peningkatan kadar norepinefrin plasma dan aktivitas saraf simpatis di otot polos pembuluh darah. Keadaan ini akan mengakibatkan vasokonstriksi dari pembuluh darah arteriol yang pada akhirnya terjadi peningkatan tekanan darah.²³

Pada orang dengan kategori hiper-reaktor mempunyai sensitivitas terhadap sistem saraf simpatis yang tinggi, oleh karena itu orang dengan kategori hiper-reaktor dapat diprediksi dalam beberapa tahun kedepan akan terpapar dengan hipertensi. Pada sebuah laporan *clinical studies* yg dilaksanakan dari tahun 1934 – 1979, dinyatakan bahwa dari anak-anak yang pada uji CPT berada didalam kategori hiperreaktor sebanyak 71 % menjadi hipertensi setelah dewasa, yang kategori normoreaktor 19% menjadi hipertensi setelah dewasa.²⁴

2.4 Aged Garlic Extract

Sejak jaman dahulu, manusia dari beberapa kebudayaan yang berbeda dan tidak pernah berhubungan satu dengan yang lain menggunakan garlic (*Allium sativum* yang termasuk *family liliaceae*.)²⁵ sebagai bahan penyembuhan yang bernilai. Garlic digunakan sebagai obat untuk beberapa penyakit, termasuk hipertensi, penyakit jantung, kanker dan infeksi.²⁶

Pada banyak penelitian farmakologi dijelaskan bahwa *aged garlic extract* mempunyai efek anti-hyperlipidemia, anti-oxidative dan memberikan perlindungan terhadap kardiovaskular. Kemampuan *garlic* dilengkapi dengan kemampuannya meningkatkan kadar fisiologis dari NO, yang berperan menjaga tonus pembuluh darah sehingga kenaikan tekanan darah yang kronik dapat dihindari.^{16,22} Pada percobaan dengan menggunakan tikus yang dilakukan oleh Morihara N (2006), garlic dapat meningkatkan produksi NO, karena S-allylcysteine dapat memicu masuknya kalsium kedalam sel endotel, selanjutnya merangsang eNOS untuk memproduksi NO.

2.4.1 Komponen Kimiawi di Dalam Bawang Putih

Umbi bawang putih segar mengandung 65 % air, 28 % karbohidrat (terutama fructans), 2,3 % organosulfur compounds (OSC), 2 % protein (terutama alliinase) dan 1,2 % asam amino bebas (terutama arginine). OSC yang utama adalah cystein sulfoxides (1 % alliin dan 0,1 % cycloalliin) dan γ -glutamylcysteines (0,6 % γ -glutamyl-S-trans-l-propenylcysteine dan 0,4 % γ -glutamyl-S-allylcysteine), 1,5% fiber, 0,15% lipid, dan jumlah yang sedikit dari asam phytic (0,08%), saponin (0,07%), dan β -sitosterol (0,0015%). Ketika umbi di memarkan, diremukkan, dikunyah atau dihaluskan enzyme allinase akan keluar dan mengubah alliin (S-allyl cysteinesulphoxide) menjadi allicin dan allyl thiosulfates.²⁵ Alliin dan alliinase tetap stabil bila dikeringkan. Satu miligram alliin memproduksi 0,458 mg allicin yang merupakan *garlic's biological activity*. Walaupun demikian, allicin tidak stabil (masa paruh waktu allicin tidak lebih dari 24 jam). dan dapat berubah ke komposisi sulfur yang lain bila dilarutkan atau direndam kedalam larutan organik tetapi menjadi inaktif pada suhu 60° C. Siung bawangputih yang utuh juga mengandung S-Allylcysteine (SAC) tetapi tidak allicin. SAC dibentuk dari katabolisme γ -glutamyl cystein dan dilaporkan yang memberikan kontribusi pada kesehatan tubuh manusia.^{31,32} Kandungan sulfur yang penting pada garlic yang homogenate adalah allyl methyl thiosulfonate, 1-propenyl allylthiosulfonate dan γ -L-glutamyl-S-alkyl-L-cystein. Bawang putih segar dan aged garlic extract (AGE) juga mengandung steroid saponin.^{26,28,35}

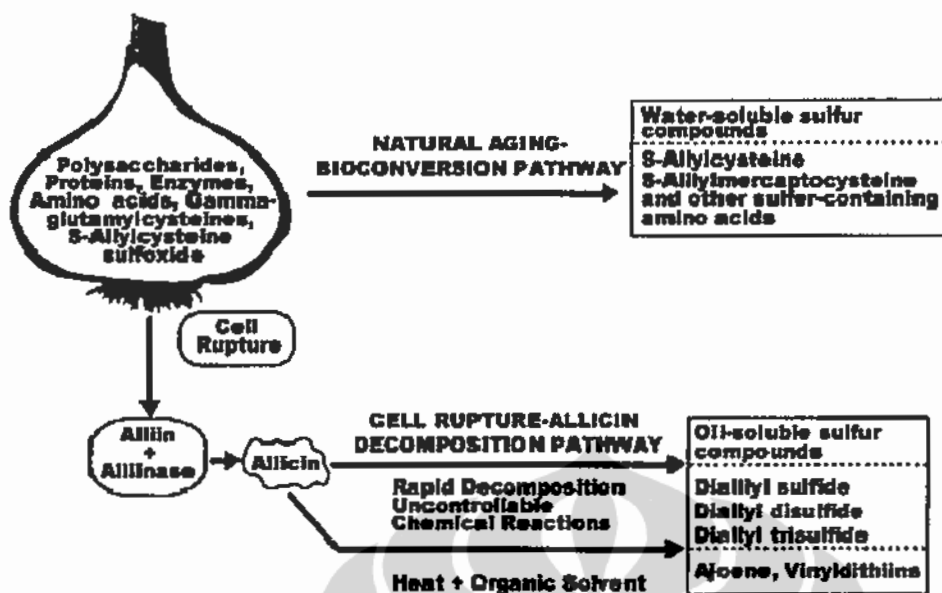
2.4.2 Sediaan Bawang Putih

Bubuk bawang putih dibuat dengan melakukan dehidrasi dari bawang putih yang telah dipipis. Kandungannya terutama alliin dan alliinase sama dengan bawang putih segar. Walaupun demikian temperature untuk *dehidrasi* tidak boleh lebih dari 60° karena lebih dari temperature tersebut alliinase menjadi inaktif.^{28,29,31}

Garlic oil dapat dibuat melalui: 1. proses *steam* destilasi, kandungannya terdiri dari diallyl (57 %), allyl methyl (37%) dan dimethyl mono sampai dengan hexa sulfide.(6%). Yang banyak digunakan adalah garlic oil yang mengandung

diallyl disulfide (DADS, 26%), diallyl trisulfide (DATS, 19%), allyl methyl trisulfide (15%), allyl methyl disulfide (13%), diallyl tetrasulfide (8%), allyl methyl tetrasulfide (6%), dimethyl trisulfide (3%), penta sulfide (4%) dan hexa sulfide (1%). 2. Sediaan yang berbentuk *oil* yang dibuat dari *garlic* yang direndam dengan minyak mempunyai kandungan vinyl-dithiins dan ajoenes. *Garlic oil* yang diekstraksi dengan bantuan ether mengandung sembilan kali lebih banyak vinyl-dithiins (5,7 mg/gm) dan allylsulfides (1,4 mg/gr) dan empat kali lebih banyak kandungan ajoenes (0,4 mg/gr).²⁹

Bentuk sediaan yang lain adalah *aged garlic extract* (AGE). Proses pembuatannya, irisan bawang putih dimasukkan kedalam ethanol 15-20 % selama 20 bulan pada suhu kamar. Keseluruhan proses dimaksudkan agar senyawa allicin menjadi hilang dan meningkatkan aktivitas kandungan baru, seperti *S-allylcysteine* (SAC), *S-allylmercaptocysteine*, *alixin* dan *selenium* yg stabil, dapat diterima tubuh karena mudah larut dalam air. SAC merupakan komponen yang sangat aman dan pada penelitian terbukti mempunyai efek biologi yang baik.³⁵ Pada pengujian yang dilakukan oleh *The US National Cancer Institute* terhadap toksisitas SAC dibanding dengan komponen *garlic* yang lain, dinyatakan bahwa SAC sangat rendah toksisitasnya dibanding dengan *allicin* dan *diallyldisulfides*. Selain itu bau yang menyengat yang ditimbulkan oleh *garlic* segar telah hilang pada sediaan AGE.^{30,31,32}



Gambar 4 Terbentuknya Kandungan Sulfur dari Umbi Bawang Putih
(sumber: <http://www.kyolic.com/research/transformation-of-sulfur-compounds-in-garlic>)

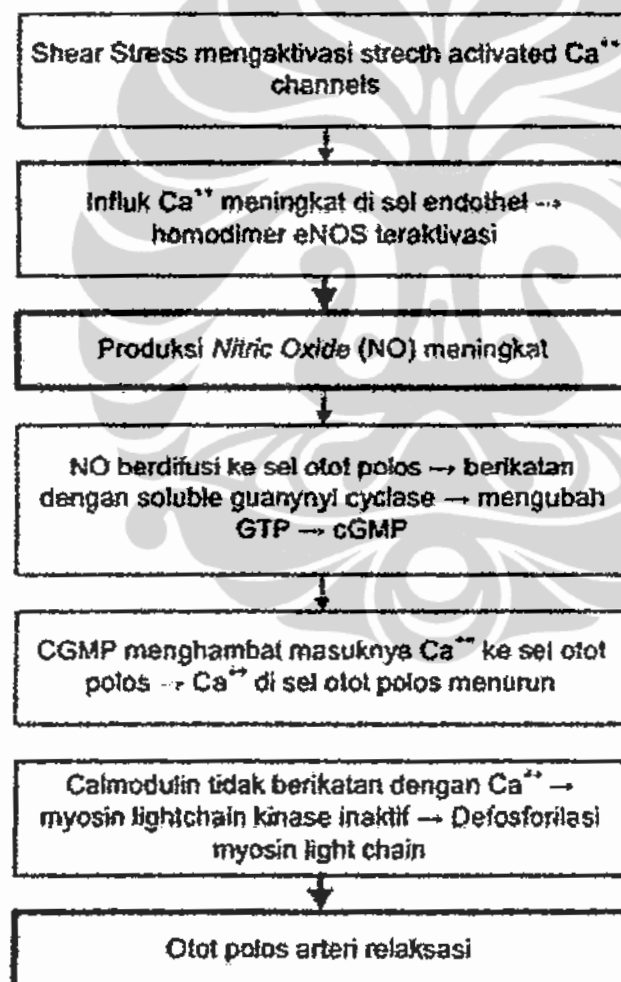
2.4.3 Proses Pembuatan Aged Garlic Extract

Diawali dengan menanam *garlic*, dimana *garlic* ditanam secara alamiah di area pertanian khusus dan dibawah kontrol yang ketat terhadap proses penanaman. *Garlic* ditanam secara organik tanpa menggunakan bahan kimia untuk pupuk, herbisida, ataupun pestisida, sehingga umbi *garlic* akan mempunyai kandungan nutrisi yang seimbang. Ketika memanen *garlic* harus didasari oleh perhitungan yang tepat, apakah umbi sudah cukup matang untuk dipanen agar kandungan nutrisi didalam *garlic* benar-benar mempunyai kadar yang sesuai standar yang diinginkan. Sesudah dipanen dilakukan *quality control* untuk menentukan umbi yang memenuhi standar yang akan digunakan sebagai bahan pembuatan *aged garlic extract*. Kemudian dilanjutkan dengan proses *aging*, dimana seluruh proses menggunakan mesin. Siung-siung *garlic* dibersihkan dan dipotong-potong yang selanjutnya dimasukkan kedalam wadah *stainless steel*, ditambahkan ethanol 15 – 20 % sampai *garlic* terendam dan dilakukan proses *aging* secara alamiah tanpa pemanasan selama 20 bulan.

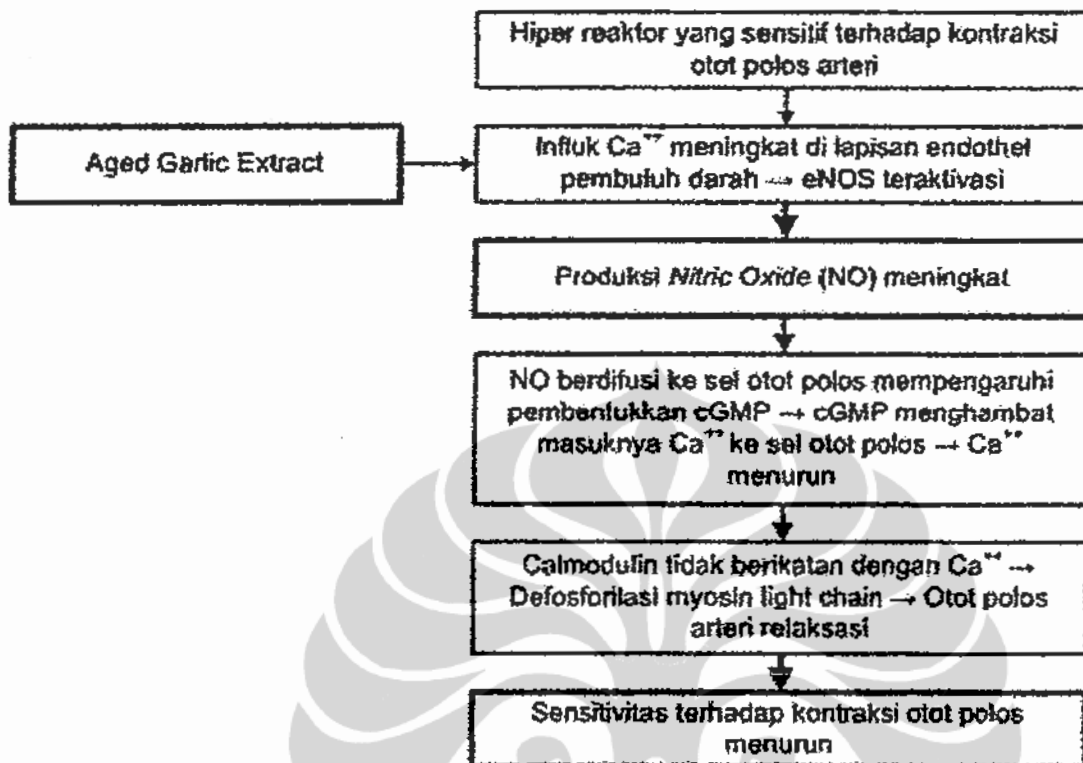
Melalui proses tersebut komponen organosulfur yang keras dan tidak stabil akan mengalami perubahan menjadi komponen sulfur yang efektif dan

stabil. Perubahan ini juga menghilangkan bau yang ditimbulkan oleh komponen sulfur yang keras. *Garlic* yang diproses dengan cara ini mengandung substansi sulfur yang mudah larut dalam air termasuk S-allylmercapto cysteine (SAMC) dan S-allyl cysteine (SAC) (lihat gambar 4) yang merupakan *antioxidant* kuat dan mempunyai *bioavailability* sebesar 98% untuk diabsorpsi kedalam darah. Selain itu juga terdapat komponen sulfur yang larut dalam minyak, flavonoids, phenol allixin dan nutrien lain termasuk selenium, etapi dalam hal ini komponen sulfur yang bermanfaat bagi kesehatan adalah komponen sulfur yang larut dalam air.³²

2.5 Kerangka Teori Penelitian



2.6 Kerangka Konsep



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian dilakukan dengan desain uji klinik acak tersamar ganda dengan 2 kelompok paralel, menguji pengaruh pemberian AGE (variabel bebas) terhadap perubahan nilai *Nitric Oxide* (NO) (variabel tergantung) pada subyek laki-laki hiper-reaktor.

3.2 Populasi dan Sampel

3.2.1 Populasi

Populasi merupakan wilayah generalisasi yang terdiri dari subyek-subyek yang mempunyai kualitas dan karakteristik tertentu yang ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari dan kemudian ditarik kesimpulannya.^{33,34} Populasi pada penelitian ini adalah laki-laki berumur 20 – 30 tahun, yang mempunyai berat badan normal, proporsional terhadap tinggi badan, memiliki hasil pengukuran tekanan darah, denyut nadi, suhu, dan pernapasan dalam rentang normal, dan termasuk kategori hiper-reaktor pada uji *Cold Presor Test* . Subyek penelitian ini adalah mahasiswa dan karyawan laki-laki di Akademi Keperawatan Antariksa Jakarta.

3.2.2 Sampel

Sampel penelitian ini adalah sebagian dari populasi mahasiswa di Akademi Keperawatan Antariksa Jakarta yang dipilih dengan metoda simple random sampling yaitu pemilihan jenis probalitas sederhana, dimana setiap subyek penelitian diseleksi secara acak (random).

Sampel yang digunakan mempunyai kriteria inklusi sebagai berikut:

1. Laki-laki.
2. Berat badan normal, proporsional terhadap tinggi badan.

3. Subyek penelitian adalah yang memiliki hasil pengukuran tekanan darah, denyut nadi, suhu dan pernapasan. dalam rentang normal.
4. Usia 20-30 tahun.
5. Subyek termasuk kategori hiper reaktor pada uji CPT.
6. Bersedia menjadi subjek penelitian dengan menandatangani formulir persetujuan (informed consent).

Dan mempunyai kriteria eksklusi sebagai berikut:

1. Menderita hipertensi
2. Tidak mengonsumsi bawang putih sebagai obat
3. Melakukan latihan fisik pada enam bulan terakhir
4. Kegemukan

Adapun kriteria drop-out adalah sebagai berikut

1. Tidak bersedia mengikuti prosedur penelitian
2. Terjadi reaksi alergi setelah minum
3. Pingsan ketika akan diambil darah

3.2.3 Rumus Besar Sampel

Penelitian ini merupakan penelitian awal (*pilot project*) untuk mendapatkan data selisih peningkatan kadar NO dalam darah pada 10 subyek hiper-reaktor didalam kelompok yang mendapat *agedgarlic extract* dan 10 subyek hiper-reaktor didalam kelompok plasebo.

3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Akademi Keperawatan Antariksa dan Makmal Terpadu Immunoendokrinologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta. Pelaksanaan penelitian dimulai dari bulan Maret sampai dengan Mei 2010, dan pengambilan data dilaksanakan pada tanggal 11 – 15 Mei 2010.

3.4 Etika Penelitian

Dalam penelitian ini, peneliti sudah mendapatkan persetujuan dari *Ethical Clearance*, dan memberikan perlindungan responden melalui penerapan etika penelitian, meliputi:

1. Diawali dengan peneliti menjelaskan kepada subyek manfaat dan resiko yang mungkin muncul dalam penelitian yang merupakan prinsip *beneficence*. Dalam penelitian ini diketahui bahwa pada orang dengan kategori hiper-reaktor pada uji *cold pressor test* merupakan orang dengan risiko tinggi terjadi hipertensi yang dapat menimbulkan keadaan patologis pada beberapa organ, misalnya jantung, otak, pembuluh darah, ginjal dan retina. Diharapkan dengan penjelasan tersebut subyek dapat mengetahui dan mencegah kemungkinan keadaan patologis yang akan terjadi pada beberapa organ tersebut. Selanjutnya peneliti meyakinkan responden dengan menunjukkan aspek- aspek *self determination* yaitu responden berhak menentukan untuk ikut atau tidak dalam penelitian tanpa ada tekanan, berhak untuk menolak memberikan informasi dan berhak untuk meminta penjelasan mengenai penelitian tersebut.
2. Peneliti menjelaskan kepada responden adanya hak privacy bagi responden, dimana kerahasiaan akan hasil-hasil penelitian akan tetap terjaga dan yang mengetahui hanya peneliti sendiri
3. Selanjutnya setelah responden bersedia, maka responden menandatangani formulir persetujuan menjadi responden sesuai dengan formulir yang telah disediakan.

3.5 Alat Pengumpulan Data

Pada penelitian ini menggunakan bahan-bahan perlakuan terhadap responden, dalam hal ini *aged garlic extract* dan pemeriksaan kadar *nitric oxide*.

3.5.1 Proses Pembuatan *Aged Garlic Extract*

Diawali dengan menanam *garlic*, dimana *garlic* ditanam secara alamiah di area pertanian khusus dan dibawah kontrol yang ketat terhadap proses penanaman. *Garlic* ditanam secara organik tanpa menggunakan bahan kimia untuk pupuk, herbisida, maupun pestisida, sehingga umbi *garlic* akan mempunyai kandungan nutrient yang seimbang. Ketika memanen *garlic* harus didasari oleh perhitungan yang tepat, apakah umbi sudah cukup matang untuk dipanen agar kandungan nutrisi didalam *garlic* benar-benar mempunyai kadar yang sesuai standar yang diinginkan. Sesudah dipanen dilakukan *quality control* untuk menentukan umbi yang memenuhi standar yang akan digunakan sebagai bahan pembuatan AGE. Kemudian dilanjutkan dengan proses aging, dimana seluruh proses menggunakan mesin. Siung-siung *garlic* dibersihkan dan dipotong-potong yang selanjutnya dimasukkan kedalam wadah *stainless steel*, ditambahkan ethanol 15 – 20 % sampai *garlic* terendam dan dilakukan proses *aging* secara alamiah tanpa pemanasan selama 20 bulan. Setelah proses aging maka *garlic* akan di keringkan dan dibuat bubuk untuk dimasukkan kedalam kapsul.

3.5.2 Pemeriksaan Kadar *Nitric Oxide* Darah

Pemeriksaan kadar *nitric oxide* menggunakan *Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit Catalog No 780001* yang dikeluarkan oleh *Cayman Chemical Company*.

3.5.2.1 Langkah-langkah Pemeriksaan

Cayman's nitrate/nitrite colorimetry assay kit adalah sebuah metoda untuk menghitung konsentrasi total dari *nitrate/nitrite* melalui dua langkah proses:

Langkah pertama adalah merubah *nitrate* ke *nitrite* dengan menggunakan *nitrate reductase*

Langkah kedua adalah penambahan reagen *Griess* untuk merubah *nitrite* menjadi *deep purple azo compound*. Kemudian dilakukan pengukuran



photometric dari absorban, hal ini bisa terjadi olehkarena *azo chromophore* secara akurat menentukan konsentrasi NO_2^- (*nitrite*).

3.5.2.2 Pembuatan Serum untuk Sediaan (Sampel)

- a. ambil 5 ml darah vena tanpa koagulan
- b. diamkan selama 15 menit
- c. lakukan pemusingan dengan mesin selama 15 menit, 3000 RPM
- d. diambil serumnya sebanyak 2 ml
- e. karena tidak langsung dikerjakan, disimpan di lemari pendinginan dengan suhu -80°C

3.5.2.3 Pembuatan Standar

- a. *vial* yang berisi *lyophilized powder* dibuka dengan perlahan-lahan dan tambahkan 1.0 ml *assay buffer*, putar perlahan-lahan sampai bercampur dengan baik.
- b. ambil 0.1 ml standar yang sudah diencerkan tambahkan 0.9 ml *assay buffer*
- c. buat 8 serial standar dengan konsentrasi 0 μl , 5 μl , 10 μl , 15 μl , 20 μl , 25 μl , 30 μl , dan 35 μl
- d. tambahkan *assay buffer* 80 μl , 75 μl , 70 μl , 65 μl , 60 μl , 55 μl , 50 μl , dan 45 μl secara berurutan di serial standar.

3.5.2.4 Persiapan Sumur-sumur (wells) dan Pembacaan Hasil

- a. pindahkan 80 μl standar serial ke dalam sumur-sumur standar
- b. masukkan 200 μl *assay buffer* kedalam sumur blanko (duplo standar)
- c. masukkan 40 μl sampel (serum) ke dalam sumur sampel, tambahkan 40 μl *assay buffer*
- d. tambahkan 10 μl *enzyme cofactor* masing-masing kedalam sumur standar dan sampel
- e. tambahkan 10 μl *nitrate reductase* masing-masing kedalam sumur standar dan sampel



- f. tutup dengan penutup, inkubasi dengan suhu ruangan selama 1 jam
- g. tambahkan 50 μ l *griess reagen R-1* kedalam sumur standar dan sampel
- h. tambahkan 50 μ l *griess reagen R-2* kedalam sumur standar dan sampel
- i. inkubasi selama 10 menit dengan suhu ruangan, agar warna menjadi muncul
- j. setelah itu dibaca dengan panjang gelombang 540 nm di *plate reader (spectrophotometry)*

3.6 Parameter Penelitian

Parameter yang diteliti dan dianalisis adalah kadar *nitric oxide* dalam darah.

3.7 Pengumpulan Data dan Analisis Statistik

Data yang diperoleh dikumpulkan dalam satu tabel induk, pengukuran kadar *nitric oxide* dilakukan dengan menggunakan *spectrophotometer*, kemudian data kadar *nitric oxide* diolah dengan menggunakan program komputer SPSS versi 15. Semua data hasil penelitian akan dianalisis secara univariat, bivariat dan multivariat.

Analisis univariat akan dilakukan untuk melaporkan distribusi data baik untuk data berskala nominal/ordinal (distribusi frekuensi) maupun untuk data berskala interval-rasio (nilai mean dengan simpang baku bila data berdistribusi normal atau nilai median dengan nilai minimum dan maksimumnya bila data tidak berdistribusi normal).

Analisis bivariat akan dilakukan untuk membandingkan perbedaan nilai masing-masing variabel yang diteliti antara sebelum dan sesudah perlakuan untuk masing-masing kelompok perlakuan, dan antara kedua kelompok perlakuan untuk membuktikan efek *Aged garlic extract* terutama terhadap perubahan nilai NO. Jika nilai variabel berdistribusi normal akan digunakan uji t berpasangan untuk



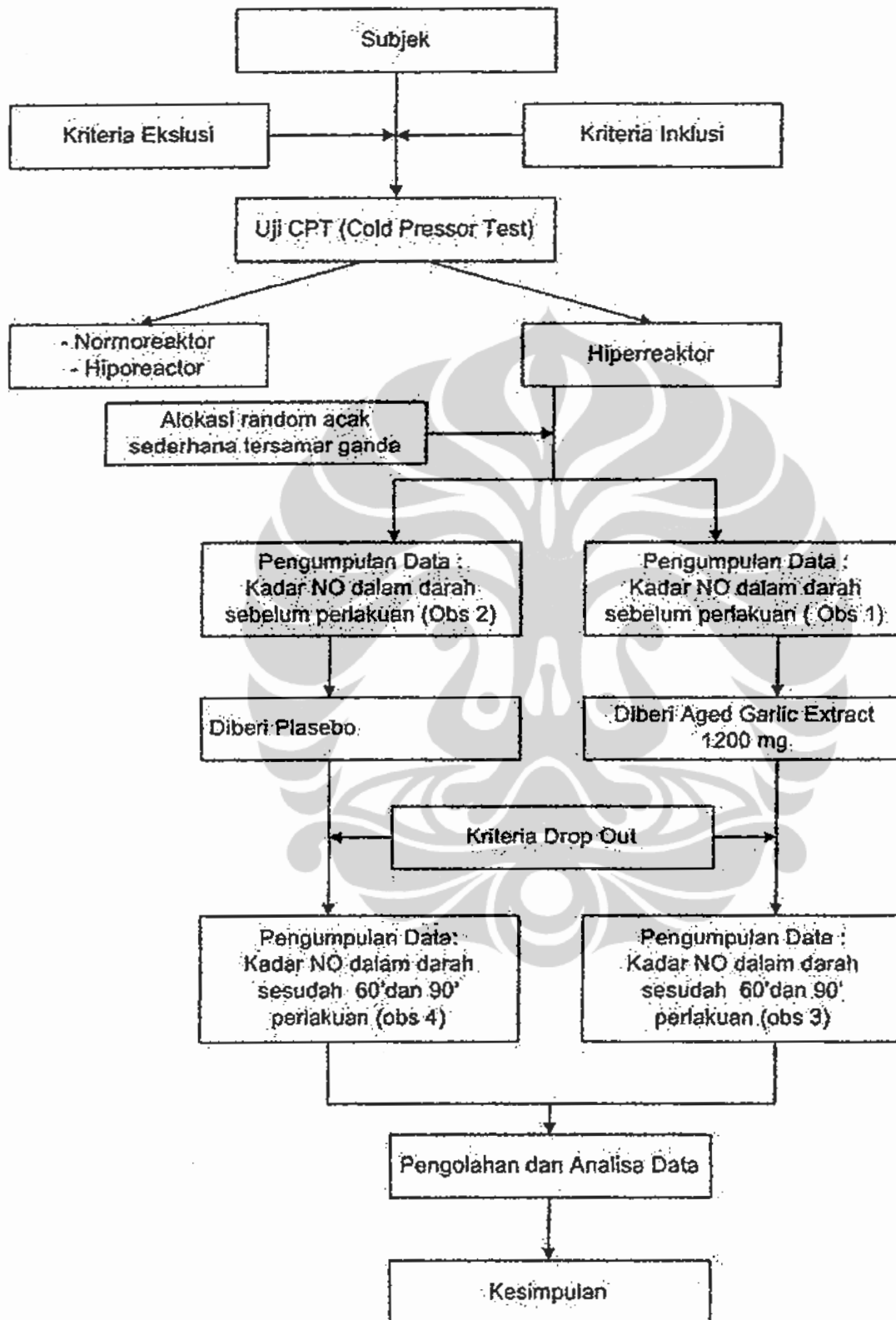
masing-masing kelompok, dan uji t tidak berpasangan antar kelompok. Bila distribusi data salah satu atau kedua variabel tidak normal maka akan dilakukan uji wilcoxon untuk masing-masing kelompok dan dengan Mann Withney U untuk antar kelompok. Uji normalitas data dilakukan dengan menggunakan uji Saphiro-Wilk, dan dinyatakan berdistribusi normal bila nilai kemaknaan $p > 0,05$. Sedangkan untuk pembuktian hipotesis, interval kepercayaan ditentukan 95% dengan tingkat kemaknaan $(p) < 0,05$.

Analisis multivariat akan dilakukan untuk melihat efek *aged garlic extract* pada beberapa kali pengukuran dibandingkan dengan kelompok plasebo, dengan menggunakan uji pengukuran berulang (*multiple-measures*).





3.8 Kerangka Operasional





3.9 Definisi operasional

3.9.1 Subyek hiper - reaktor

Definisi: adalah orang yang akan mengalami kenaikan tekanan sistolik lebih besar dari 20 mmHg dan tekanan diastolik lebih besar dari 15 mmHg dari tekanan basal ketika dilakukan uji *Cold Pressor Test*. Orang dengan kategori hiper-reaktor mempunyai sensitifitas tinggi pada sistem saraf simpatik dan penurunan kemampuan endotel untuk membentuk *nitric oxide*. Pada beberapa studi klinis memperlihatkan hasil bahwa orang hiper-reaktor adalah risiko tinggi untuk terjadi hipertensi.

3.9.2 Nitric Oxide

Definisi: Merupakan vasodilator endogen dan berperan sangat penting untuk mengontrol fungsi fisiologis dari sistem kardiovaskular. *Nitric oxide* diproduksi oleh *endothelial nitric oxide synthase (eNOS)* di sel endotel sebagai respon terhadap tenaga mekanik yang timbul di pembuluh darah dan agonis seperti asetilkolin, estrogen, bradikinin, serta *vascular endothelial growth factor (VEGF)*. eNOS adalah isoform NOS yang merupakan protein membran perifer yang banyak ditemukan di plasmalema caveolae membran sel endotel pembuluh darah arteri. Kerusakan pada pembentukan *nitric oxide (NO)* akan memberi dampak pada terjadinya peningkatan tonus pembuluh darah.

3.9.3 Aged Garlic Extract (AGE)

Definisi: Sediaan bawang putih yang diproses dengan proses *aging* yang mengandung S- allylcysteine, S-allyl Mercaptocysteine, allixin dan selenium yang stabil dan dapat diterima tubuh dengan baik dan sebagai antioksidan yang signifikan. Komponen *aged garlic extract* tersebut tidak ditemukan pada *garlic* mentah ataupun yang sudah mendapatkan proses pemanasan.



BAB IV

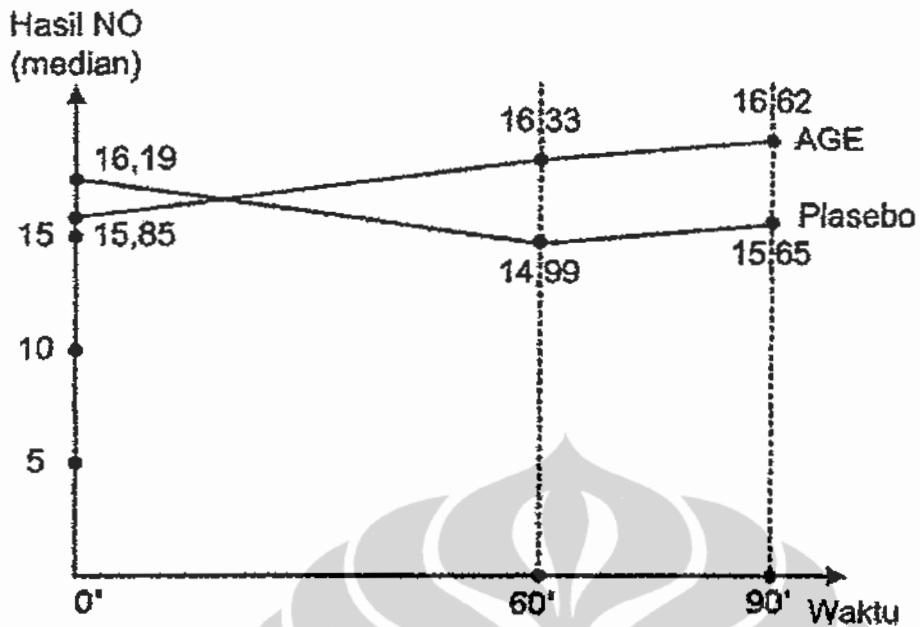
HASIL PENELITIAN

Penelitian telah dilakukan di Akademi Keperawatan Antariksa dan Makmal Terpadu Immunoendokrinologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta. Pelaksanaan penelitian dimulai dari bulan Maret sampai dengan Juni 2010 (sampai dengan penyusunan laporan), dan pengambilan data dilaksanakan pada tanggal 11 – 15 Mei 2010.

Hasil yang diharapkan dari penelitian ini adalah terjadinya peningkatan kadar *nitric oxide* dalam darah pada menit ke 60 dan 90 setelah subyek dengan kategori hiper-reaktor pada uji *cold pressor test* diberi *aged garlic extract* dengan dosis 1200 mg per oral dibandingkan dengan subyek yang diberi plasebo. Parameter yang diukur adalah kadar *nitric oxide* dalam darah subyek sebelum perlakuan, 60 menit sesudah perlakuan, dan 90 menit sesudah perlakuan, dengan memberikan *aged garlic extract* 1200 mg per oral..

Hasil pemeriksaan kadar *nitric oxide* baik pada sebelum perlakuan maupun sesudah perlakuan pada menit ke 60 maupun menit ke 90 , setelah dilakukan analisis univariat dalam hal ini menggunakan uji *Saphiro Wilk* karena jumlah sampel dibawah 30, mendapatkan hasil bahwa data berdistribusi tidak normal, maka dilakukan penghitungan nilai median dengan nilai minimum dan maksimum, Hasil pemeriksaan kadar *nitric oxide* sebelum perlakuan, dan 60 menit serta 90 menit sesudah perlakuan pada kedua kelompok ditampilkan dalam nilai median, setelah dibuat grafik terlihat bahwa cenderung terjadi peningkatan kadar *nitric oxide* sesudah perlakuan pada kelompok AGE, pada kelompok plasebo kecenderungannya adalah menurun dan fluktuatif (gambar 6). Interpretasi hasil adalah ada kecenderungan peningkatan kadar *nitric oxide* pada kelompok AGE sesudah diberikan perlakuan. Akan tetapi setelah dilakukan analisis bivariat hasilnya adalah tidak berbeda bermakna.





Gambar 5 Nilai Median Kadar Nitric Oxide Pada Kelompok AGE dan Placebo Sebelum Perlakuan, 60' dan 90' Sesudah Perlakuan

Analisis bivariat dilakukan untuk membandingkan perbedaan nilai antara dua kelompok perlakuan dan masing-masing kelompok perlakuan untuk membuktikan efek *aged garlic extract* terhadap perubahan nilai *nitric oxide*.

Data untuk perbedaan nilai antara dua kelompok, jika berdistribusi normal maka dilakukan uji t tidak berpasangan sedangkan yang berdistribusi tidak normal dilakukan uji Mann Withney U. Untuk pemeriksaan kadar nitric oxide sebelum dan sesudah perlakuan antara kedua kelompok berdistribusi tidak normal maka dilakukan uji Mann Withney U, didapatkan hasil penghitungan nilai kemaknaan (nilai p) sebelum perlakuan $p = 0,912$; 60 menit sesudah perlakuan $p = 0,912$; 90 menit sesudah perlakuan $p = 1,000$. Interpretasi dari hasil tersebut adalah bahwa peningkatan kadar *nitric oxide* sebelum pemberian dan sesudah pemberian *aged garlic extract* antara kedua kelompok tidak memperlihatkan perbedaan bermakna, seperti yang terlihat di tabel 1.



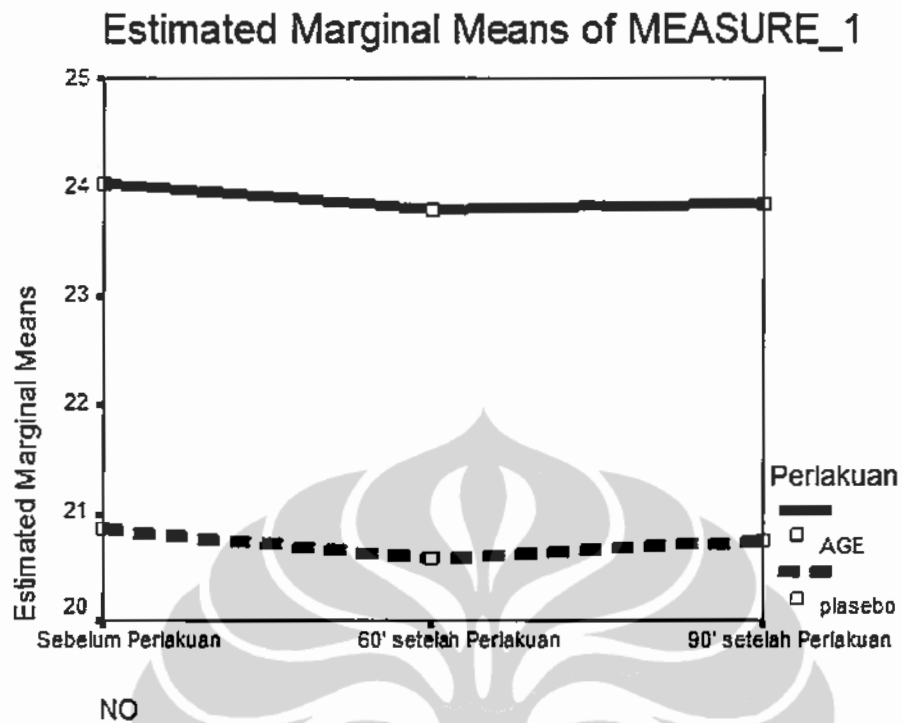
Tabel 1 Kadar NO sebelum dan setelah perlakuan dengan AGE

Kadar NO	Kelompok AGE (n = 10)	Kelompok placebo (n = 10)	Nilai P
Sebelum perlakuan dengan AGE	15,85 (9,18 – 73,92)	16,19 (11,79 – 56,12)	0,912 (M-W)
60' setelah diberi AGE	16,33 (8,72 – 79,96)	14,99 (11,41 – 59,86)	0,912 (M-W)
90' setelah diberi AGE	16,62 (9,10 – 77,69)	15,65 (13,04 – 56,74)	1,000 (M-W)
Δ 60'	-0,23 (\pm 2,84)	-0,27 (\pm 1,88)	0,970 (unpaired-t)
Δ 90'	-0,17 (\pm 2,75)	-0,10 (\pm 2,06)	0,953 (unpaired-t)

Untuk data perbedaan *nilai nitric oxide* sebelum dan sesudah perlakuan pada masing-masing kelompok antara dua kelompok berdistribusi normal, maka dilakukan penghitungan *mean* dan simpang baku dan dilakukan uji t tidak berpasangan dengan nilai $p = 0,970$ untuk Δ 60 menit dan $p = 0,953$ untuk Δ 90 menit. Interpretasi hasil data tersebut adalah perbedaan peningkatan kadar *nitric oxide* sebelum dan sesudah perlakuan tidak memperlihatkan perbedaan bermakna, seperti yang terlihat di tabel 1.

Selanjutnya dilakukan analisis multi variat untuk melihat efek *aged garlic extract* pada beberapa kali pengukuran berulang kadar *nitric oxide*, dibandingkan antara kelompok perlakuan dengan kelompok plasebo dengan menggunakan uji *multiple – measures*. Hasil nilai kemaknaanya adalah $p = 0,904$ untuk nilai *nitric oxide* dari waktu ke waktu dan $p = 0,995$ untuk melihat apakah nilai *nitric oxide* dari waktu ke waktu tersebut berbeda antara kelompok perlakuan dengan kelompok plasebo. Interpretasi hasil data tersebut adalah, nilai *nitric oxide* dari waktu ke waktu tidak berbeda bermakna dan nilai *nitric oxide* dari waktu ke waktu tersebut tidak ada kaitannya dengan beda perlakuan, seperti yang terlihat pada gambar 5.





Gambar 6 Pengukuran Berulang Kadar NO Sebelum dan Setelah 60' dan 90' Perlakuan (tidak ada peningkatan bermakna, $P > 0.05$)



BAB V

PEMBAHASAN

Pada saat sekarang telah diketahui bahwa *garlic* mempunyai komponen biologi yang aktif yang mempunyai berbagai efek yang menguntungkan di tubuh manusia. Komponen bioaktif yang dimiliki oleh *garlic* sangat tergantung kepada proses pembuatannya, seperti S-allylcysteine (SAC) dan S-allylmercaptocysteine merupakan zat bioaktif yang dibentuk oleh *garlic* melalui proses *aging*.^{31,32} S-allylcysteine telah dilaporkan dapat meningkatkan produksi *nitric oxide* sebesar 30 – 40 % antara 15 menit sampai 60 menit sesudah pemberian *aged garlic extract* pada percobaan dengan menggunakan tikus.⁴ Sepengetahuan peneliti belum ada penelitian yang dilakukan terhadap manusia, untuk mengetahui efek *aged garlic extract* terhadap peningkatan kadar *nitric oxide*.

Penelitian ini bertujuan untuk melihat apakah pemberian *aged garlic extract* 1200mg per oral dapat meningkatkan kadar *nitric oxide* pada orang dengan kategori hiper-reaktor ketika diuji dengan *cold pressore test*, karena orang dengan hiper-reaktor adalah orang yang sensitivitas terhadap sistem saraf simpatisnya tinggi dan dapat diprediksi pada kemudian hari akan terpapar dengan hipertensi.¹³ Hipersensitivitas pada sistem saraf simpatis akan memicu terjadinya kerusakan pada sel endotel pembuluh arteri yang berarti proses pembentukan *nitric oxide* akan terganggu.^{1,13,16} Dilepasnya *nitric oxide* oleh *endothelial nitric oxide synthase* berperan dalam memelihara homeostasis pembuluh darah. Ketika terjadi perubahan pada *shear stress* ataupun adanya rangsang pada reseptor agonis, *nitric oxide* dilepas di endotel pembuluh darah untuk mempertahankan aliran darah dengan menghambat peningkatan tonus vaskular dan agregasi platelet. Pada orang hiper-reaktor bila homeostasis vaskularnya selalu terjaga maka arteri akan menjadi lebih relaks, sehingga keadaan konstiksi pada pembuluh darah yang kronik tidak terjadi berarti perkembangan hipertensi dapat dicegah.^{13,14}



Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa peningkatan kadar *nitric oxide* sebelum pemberian dan sesudah 60 menit dan 90 menit pemberian *aged garlic extract* cenderung terjadi peningkatan pada kelompok AGE dibandingkan dengan kelompok plasebo yang cenderung menurun dan fluktuatif namun setelah dilakukan perhitungan statistik kadar *nitric oxide* sebelum, 60` dan 90` sesudah pemberian *aged garlic extract* antara kedua kelompok tidak memperlihatkan perbedaan bermakna, diperlihatkan dengan (nilai p) sebelum perlakuan $p = 0,912$; 60 menit sesudah perlakuan $p = 0,912$; 90 menit sesudah perlakuan $p = 1,000$.

Sedangkan perbedaan nilai *nitric oxide* sebelum dan sesudah perlakuan pada masing-masing kelompok, didapatkan hasil $p = 0,970$ untuk Δ 60menit dan $p = 0,953$ untuk Δ 90 menit. Interpretasi hasil data tersebut adalah perbedaan peningkatan kadar *nitric oxide* sebelum dan sesudah perlakuan tidak memperlihatkan perbedaan bermakna.

Jika dilihat dari tabel - 1, hasil pada kelompok perlakuan terlihat cenderung meningkat sedangkan pada kelompok plasebo terlihat berfluktuasi maka dapat diartikan bahwa sebenarnya walaupun sedikit memang ada kecenderungan peningkatan kadar *nitric oxide* pada subyek yang diberi *aged arlic extract* tetapi hasil analisis statistik mengatakan tidak berbeda bermakna. Hasil yang menyimpang dari yang diharapkan, seperti tertera pada hipotesa, kemungkinan adalah karena banyak faktor yang mempengaruhi pembentukan *nitric oxide*, disamping masuknya kalsium kedalam sel dan interaksi dari protein-protein, juga pengaturan tempat berikatannya eNOS ke caveolae dapat diganggu oleh low density lipoprotein (LDL) yang teroksidasi. LDL yang teroksidasi dapat menyebabkan eNOS tidak terikat di caveolae dan mengurangi jumlah caveolae di membran sehingga akan mengganggu pengaturan aktivasi eNOS, jika eNOS tidak teraktivasi maka tidak terjadi pembentukan NO.¹ Pada penelitian ini, memang tidak diperiksa nilai LDL subyek. Kemungkinan yang lain adalah jumlah sampel yang kurang.

Pada uji *multiple – measures*, didapat hasil $p = 0,904$ untuk nilai *nitric oxide* dari waktu ke waktu dan $p = 0,995$ untuk melihat apakah nilai *nitric oxide* dari waktu ke waktu tersebut berbeda antara kelompok perlakuan dengan



kelompok plasebo. Interpretasi dari hasil nilai p tersebut adalah, nilai *nitric oxide* dari waktu ke waktu tidak berbeda bermakna dan nilai *nitric oxide* dari waktu ke waktu tersebut tidak ada kaitannya dengan beda perlakuan.

Pada meta-nalisis dan *systematic review* yang dilaksanakan oleh Ried K. 2008, menganalisis penelitian-penelitian efek *garlic* dengan berbagai macam sediaan yang terstandar terhadap tekanan darah termasuk *aged garli extract* antara tahun 1995 sampai dengan 2007, walaupun didapatkan hasil bahwa sediaan *garlic* mempunyai hasil yang sangat baik dibandingkan dengan plasebo dalam hal menurunkan tekanan darah, akan tetapi rata-rata penelitian yang dilakukan hanya melihat hasil dari perubahan tekanan darah setelah diberi berbagai macam sediaan *garlic*. Hasil dari *meta-regression analysis* memperlihatkan tidak ada korelasi antara perubahan tekanan darah dengan dosis, dan lamanya intervensi. Selain itu belum terlihat penelitian yang mengetengahkan proses fisiologis yang terjadi di pembuluh darah dan penelitian lebih banyak menggunakan binatang percobaan. Dengan demikian hasil yang tidak bermakna dalam penelitian ini, mungkin disebabkan oleh hasil yang bermakna pada tikus tidak dapat diekstrapolasikan ke manusia, seperti perhitungan dosis yang tepat, lamanya pemberian *aged garlic extract*, seperti yang dicantumkan didalam rata-rata penelitian yang digunakan untuk meta-analysis tersebut, penelitian yang menggunakan manusia dosis yang digunakan antara 600 – 900 mg dengan lama pemberian 12 – 23 minggu. Selain itu kemungkinan yang lain adalah durasi yang tepat dari proses metabolisme *aged garlic extract* mungkin berbeda antara tikus dengan manusia.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

1. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa sediaan *aged garlic extract* sebanyak 1200 mg yang diberikan per oral kepada manusia cenderung meningkatkan kadar *nitric oxide* darah sesudah 60' dan 90' dibandingkan dengan kelompok yang diberi plasebo, akan tetapi setelah dilakukan penghitungan statistik peningkatan kadar *nitric oxide* sesudah 60' dan 90' pemberian *aged garlic extract* ataupun plasebo dibandingkan dengan kadar *nitric oxide* sebelum pemberian *aged garlic extract* ataupun plasebo pada kedua kelompok menjadi tidak berbeda bermakna.
2. Peningkatan kadar *nitric oxide* setelah 60' dan 90' pemberian plasebo dibandingkan dengan sebelum pemberian pada kelompok plasebo cenderung menurun dan fluktuatif, setelah dilakukan penghitungan statistik peningkatan kadar *nitric oxide* sesudah 60' dan 90' pemberian plasebo dibandingkan kadar *nitric oxide* sebelum diberi plasebo tidak berbeda bermakna.
3. Peningkatan kadar *nitric oxide* setelah 60' dan 90' pemberian *aged garlic extract* dibandingkan dengan sebelum pemberian *aged garlic extract* cenderung meningkat, Namun setelah dilakukan penghitungan statistik peningkatan kadar *nitric oxide* sesudah 60' dan 90' pemberian *aged garlic extract* dibanding dengan sebelum pemberian tidak berbeda bermakna

6.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian tentang kemampuan *aged garlic extract* membuka kanal kalsium di endotel sehingga terjadi *influx* kalsium yang berlimpah kedalam sel, yang kemudian akan mendorong pembentukan *nitric oxide* oleh *endothelial nitric oxide synthase*, seperti yang di laporkan oleh penelitian dengan menggunakan hewan coba bahwa *aged garlic extract* terutama S-



allylcystein mempengaruhi pembentukan *nitric oxide* melalui terjadinya *influx* kalsium kedalam sel endotel.

2. Jika target sel *aged garlic extract* adalah sel endotel pembuluh arteri, maka perlu dilakukan penelitian tentang proses absorpsi dari saluran gastrointestinal ke kapiler, penelitian tentang protein *carrier* (substansi lain) yang membawa *aged garlic extract* dari dalam darah sampai keluar ke ruang interstisium lapisan sel endotel dan kemudian di transpor kedalam sel endotel pembuluh darah tersebut.
3. Jika didalam tubuh seluruh zat atau senyawa yang masuk kedalam darah akan terjadi biotransformasi, perlu pula dilakukan penelitian tentang apakah ada biotransformasi struktur *aged garlic extract* oleh enzim-enzim yang ada di tubuh.
4. Perlu juga dilakukan penelitian apakah *aged garlic extract* mempunyai kemampuan mempengaruhi gen-gen yang mempengaruhi produksi *nitric oxide* menjadi menurun pada orang dengan hipertensi, sehingga gen tersebut dapat ditekan sehingga *endothelial nitric oxide synthase* dapat memproduksi *nitric oxide* dalam jumlah cukup agar homeostasis tonus arteri dapat pulih dan tetap terjaga dengan baik pada orang dengan hipertensi.



DAFTAR PUSTAKA

1. Chatterjee A., Catravas J.D. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascul Pharmacol*; 49 (4-6): 134 – 140. doi: 10.1016/j.vph.2008.
2. Michael SK, Surks HK, Wang Y, Blanton R, Jamnongjit M, Aronovitz M, et al. High blood pressure arising from a defect in vascular function. Molecular Cardiology Research Institute, Tufts University School of medicine Boston; 2008 March.
3. Kansui Y., Garland C.J., Dora K.A. Enhanced spontaneous Ca^{2+} in endothelial cells reflect signaling through myoendothelial gap junctions in pressurized mesenteric arteries. *Cell Calcium*; 44(2): 135 – 146. doi: 10.1016/j.ceca.2008.
4. Morihara N, Sumioka I, Moriguchi T, Uda N, Kyo E. Aged garlic extract maintains cardiovascular homeostasis in mice and rats 1,2. *The journal of nutrition.Bethesda*. 136(3S): 777-81. 2006 March.
5. Ried K., Frank O.R., Stocks N.P., Fakler P. Sullivan T. Effect of garlic on blood pressure: A systematic review and meta-analysis. *BMC Cardiovascular Disorder* 8: 13 doi:10.1186/1471-2261-8-13; 2008.
6. Mc Cance KL, Huether SE. *Pathophysiology : the biologic basis for disease in adults and children*. 5th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier mosby; 2006.
7. Lilly L.S. *Pathophysiology of Heart Disease*; 4th ed.Lippincot Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business; 2007.
8. Oparil S., Zaman A., David A., Calhoun. Pathogenesis of Hypertension. *AnnIntern Med*; 139: 761 – 776. 2003.
9. Levy M.N.,Pappano A.J. *Cardiovascular Physiology*. 9th edMosby,Inc.,an affiliate of Elsevier Inc; copyright © 2007.
10. Mohrman D.E., Heller L.J. *Cardiovascular Physiology*. 6th ed. The Mc Grow-Hills companies. 2006.
11. Guyton A.C., Hall J.E. *Textbook of Medical Physiology*. 11th ed. Elsevier Saunders. 2006.
12. Silverthorn D.U. *Human physiology: an integrated approach*. 4th ed. San Francisco: Pearson Benyamin Cummings. 2007.
13. Chen J. et al. (Collaborative Reseach Group). Association between Blood Pressure Responses to Cold Pressor Test and Dietary Sodium Intervention in the Chinese Population. *Arch Intern Med*; 168(16):1740 – 1746. doi:10.1001/archinte.168.16.1740; 2008.



14. Delaney P.E., Young C.N. DiSabatino A., Stillabower M.E. Farquhar W.B. limb venous tone and responsiveness in hypertensive humans. Department of Health, Nutrition, and Exercise sciences, University of Delaware, Newark-Delaware. 2008.
15. Colman RW, Clowes AW, Goldhaber SZ, Marder VJ, George JN. Hemostasis and thrombosis : Basic principles and clinical practice. 5th ed. Philadelphia, USA: Lippincot Williams & Wilkins; 2006.
16. Dudzinski D.M., Michael T. Live history of eNOS: Partners and pathways. *Cardiovascular research* 25; 247 – 260. 2007.
17. Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem.J.*357, 593 – 615. 2001.
18. Frank P.G., Lisanti M.P. Role of caveolin- 1 in the regulation of the vascular shear stress response. *J.Clin Invest*, 116: 1222 – 1225. doi: 1172/JCI 28509. 2006.
19. Smith C, Marks A, Lieberman M. Basic medical biochemistry : a clinical approach. 2nd ed. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
20. Govers R. Rabelink T.J. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol* 280: F193-F206. 2001.
21. Fleming I., Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284: R1 –R12, 10.1052/ajpregu. 00323. 2002.
22. Gratton J.P., Bernatchez P., Sessa W.C. Caveolae and caveolins in the cardiovascular system. *American Heart Association*. Doi: 10.1161/01.RES.0000129178.56294.17 . 2004.
23. Nakamura T., Kawabe K., Sapru H.N. Cold pressor test in the rat: medullary and spinal pathways and neurotransmitters. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295(4): H1780-H1787 . 2008.
24. Wood D.L., Sheps S.G., El Veback L.R. Cold pressor test as a predictor of hypertension. *Hypertension*; 6:301-306. [PubMed: 6735451]. 1984.
25. Blumenthal M, Wollschlaeger B. The ABC clinical guide to herbs. 1st ed. Austin, Texas: American botanical council; 2003.
26. Rahman K, Lowe GM. Garlic and cardiovascular disease: A critical review. *American society for nutrition J.nutr.Bethesda.*; 136: 736-40. 2006.
27. Park K.S., Ku D.D. Garlic elicits a nitric oxide-dependent relaxation and inhibits hypoxic pulmonary vasoconstriction in rats. (journal). *Clinical experiment pharmacol physiol*. 2000.



28. Banerjee SK, Maulik SK. Effect of Garlic on Cardiovascular Disorder: a review. *Nutritional Journal*. last updated 2007 September; doi: 10.1186/1475-2891: 1-4.
29. Lawson L.D., Gardner C.D. Composition, Stability, and Bioavailability of Garlic Products Being Used in a Clinical Trial. *J Agric Food Chem*; 53(16): 6254-6261. doi: 10.1021/jf.050536+. 2005.
30. Sun X., Ku D.D. Allicin in garlic protects against coronary endothelial dysfunction and right heart hypertrophy in pulmonary hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H2431-H2438. 2006.
31. Duda G., Suliburska J., Musialik D.P. effects of short-term garlic supplementation on lipid metabolism and antioxidants status in hypertensive adults. *Pharmacological Reports* 60, 163 – 170 ISSN 1734-1140. 2008.
32. Cruz C., Rotter Correa R., Gonzales S. Et al. Renoprotective and antihypertensive effects of S-allylcysteine in 5/6 nephrectomized rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 293: F1691-F 1698. 2007.
33. Sastroasmoro S., Ismael S. *Dasar-Dasar Metodologi Penelitian Klinis edisi ke-2*. CV Sagung Seto. 2006.
34. Sugiyono. *Metode Penelitian Kuantitatif, Kualitatif, dan R&D*. Cetakan kesatu. Penerbit Alfabeta, Bandung. 2006.
35. Harauma A., Moriguchi T. Aged Garlic Extract Improves Blood pressure in Spontaneously Hypertensive Rats More Safely than Raw Garlic. *American Society for Nutrition J.Nutr* 136: 769S-773S. 2006.



LAMPIRAN 1

Hasil Pengukuran Tekanan Darah pada Uji CPT (Pengambilan Sampel)

NO Responden	Tek. Sistolik basal	Tek. Sistolik sesudah 30' uji CPT	Tek. Sistolik sesudah 60' uji CPT	Tek. Diastolik basal	Tek. Diastolik sesudah 30' uji CPT	Tek. Diastolik sesudah 60' uji CPT
001	120	140	160	80	80	
002	110	100	90	70	60	60
003	135	140	140	80	100	110 *
004	120	125	130	70	70	80
005	120	140	130	70	80	80
006	100	110	140	60	80	100 *
007	130	160	165	70	110	110 *
008	130	140	140	90	100	110 *
009	120	130	130	80	100	100
010	110	100	120	70	70	80
011	120	150	160	70	90	100
012	130	130	120	70	90	80
013	130	140	150	80	100	100
014	120	140	145	80	90	90
015	120	150	160	80	100	100
016	110	120	130	80	80	90
017	130	140	140	80	100	100
018	120	140	150	70	90	100
019	120	160	180	80	100	100
020	110	130	130	70	90	100
021	130	130	130	100	100	100
022	120	140	160	70	100	100
023	130	140	130	80	100	100
024	120	120	130	80	90	90
025	110	130	140	70	90	100
026	120	120	130	80	90	90
027	130	130	140	70	100	100
028	100	140	160	90	100	110
029	110	140	160	80	100	100
030	Tidak berse	dia				
031	Tidak berse	dia				
032	130	160	180	80	110	130
033	120	130	140	90	100	100
034	110	110	130	70	70	70
035	100	130	150	70	90	100
036	120	140	160	80	100	120



037	120	140	Tak terdengar	80	90	Tak terdengar
038	Tidak berse	dia				
039	130	140	143	90	100	105
040	100	120	130	60	90	90
041	120	140	143	70	90	94
042	Tidak berse	dia				
043	Tidak berse	dia				
044	110	150	160	80	100	110
045	120	110	120	80	70	80
046	130	140	Tak terdengar	80	90	Tak terdengar
047	100	90	80	70	60	60
048	120	150	170	70	100	110
049	120	146	160	80	100	120
050	Tidak berse	dia				
051	110	150	160	90	100	100
052	Tidak berse	dia				
053	Tidak berse	dia				
054	Tidak berse	dia				
055	100	120	150	60	90	110
056	100	120	150	70	90	100
057	120	140	150	90	100	100
058	110	140	125	80	90	90
059	120	130	130	80	100	100
060	110	120	125	80	90	90
061	120	130	150	70	90	100
062	120	150	150	70	100	100
063	110	120	125	70	90	90
064	120	130	130	60	80	80
065	120	140	140	80	100	100
066	120	140	140	60	80	80
067	130	140	150	80	100	100
068	130	140	140	60	100	110
069	120	140	140	60	70	70
070	130	130	120	70	70	70
071	120	130	140	90	100	100



LAMPIRAN 2

Hasil Pemeriksaan Kadar Nitric Oxide Prapenelitian

NO	Nomor Responden	Kadar NO sebelum perlakuan	Kadar NO sesudah 30' perlakuan	Kadar NO sesudah 60' perlakuan	Kadar NO sesudah 90' perlakuan
1	056	33.672	22.336	34.026	34.592
2.	049	19.926	17.802 (darah lisis)	18.864	21.414
3.	051	21.344	23.894	21.556	20.776
4.	055	134.779	121.1	119.33	116.708





LAMPIRAN 3

Hasil Penelitian Peningkatan Kadar Nitric Oxide

NO	Nomor Respon den	Kadar NO sebelum perlakuan	Kadar NO sesudah 60' perlakuan	Kadar NO sesudah 90' perlakuan
1	025	15.62	14.48	12.5
2.	022	9.18	8.72	9.44
3	020	9.93	12.06	9.10
4	044	73.92	79.96	77.69
5	048	25.12	21.53	22.32
6	019	16.08	16.58	19.55
7	062	21.61	18.18	17.40
8	067	11.72	10.16	13.89
9	061	41.79	40.15	40.77
10	071	15.22	16.08	15.85
11	065	16.39	15.30	14.13
12	066	19.82	17.33	17.09
13	034	56.12	59.86	56.74
14	028	19.43	21.07	17.64
15	035	16.00	13.28	14.60
16	036	27.69	27.92	31.12
17	018	11.79	11.41	13.19
18	057	11.79	11.41	13.19
19	032	14.37	13.51	13.04
20	040	15.07	14.68	16.70

Keterangan:

Nomor 1 – 10 : kelompok perlakuan

Nomor 11- 20 : kelompok plasebo



LAMPIRAN 4

Hasil Pemeriksaan Kadar NO Lengkap Beserta Duplo

NO BU KUNI 270510

Unknowns(no ditn)

Sample	Wells	OD Values	Concentration
Un01	B3	0.224	8.040
	B4	0.212	7.573
Un02	C3	0.201	7.144
	C4	0.208	7.339
Un03	D3	0.176	6.170
	D4	0.150	6.226
Un04	E3	0.137	4.851
	E4	0.134	4.534
Un06	F3	0.128	4.301
	F4	0.131	4.418
Un06	G3	0.138	4.690
	G4	0.139	4.729
Un07	H3	0.145	4.983
	H4	0.145	4.963
Un08	A5	0.188	6.560
	A6	0.159	5.600
Un09	B5	0.147	5.041
	B6	0.122	4.067
Un10	C5	0.952	36.398
	C6	0.981	37.525
Un11	D5	1.034	39.560
	D6	1.054	40.389
Un12	E5	0.989	37.837
	E6	1.041	39.862
Un13	F5	0.344	12.714
	F6	0.330	12.402
Un14	G5	0.298	10.922
	G6	0.290	10.611
Un15	H5	0.302	11.078
	H6	0.306	11.234
Un16	A7	0.225	8.079
	A8	0.223	8.001
Un17	B7	0.227	8.157
	B8	0.234	8.429
Un18	C7	0.280	9.442
	C8	0.277	10.104
Un19	D7	0.295	10.805
	E7	0.251	9.092
Un20	F7	0.241	8.702
	D8	0.168	5.858
Un20	G7	0.148	5.080
	H7	0.196	6.940
Un21	E8	0.554	20.894
	F8	0.539	20.076
Un22	G8	0.541	20.357
	A9	0.213	7.812

6/6/2010 12:01:58 PM

pen ibu kuni NO 270510 iii.pda

Copyright © 2001 Molecular Devices Corp. All rights reserved.



NO BU KUNI 270510

	B9	0.224	8.040
	H8	0.221	7.923
Un23	C9	0.228	8.196
	D9	0.214	7.650
	E9	0.199	7.068
Un24	F9	0.272	8.910
	G9	0.240	8.663
	H9	0.237	8.546
Un25	A10	0.738	28.060
	B10	0.786	29.930
	C10	0.746	28.372
Un26	D10	0.267	9.715
	E10	0.288	10.633
	F10	0.244	8.819
Un27	A11	0.223	8.001
	G10	0.188	6.638
	H10	0.205	7.300
Un28	B11	0.373	13.844
	C11	0.376	13.980
	D11	0.417	15.557
Un29	E11	0.189	6.898
	F11	0.189	6.677
	G11	0.179	6.287
Un30	A12	0.169	6.898
	B12	0.164	6.703
	H11	0.167	6.599
Un31	C12	0.202	7.183
	D12	0.191	6.755
	E12	0.185	6.521
Un32	F12	0.241	7.534
	G12	0.206	7.339
	H12	0.232	8.352

R - Outside standard range

5/8/2010 12:01:58 PM

pen ibu kuni NO 270510 iii.pda
 Copyright © 2001 Molecular Devices Corp. All rights reserved.



LAMPIRAN 5

Hasil Pemeriksaan Kadar NO Lengkap Beserta Standar

NO BU KUNI 270510

		Plate#1													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
A	0.003 -0.003	0.934	0.972	0.166	0.166	0.225	0.225	0.216	0.733	0.223	0.166	Endpoint			
	0.003 -0.003	0.934	0.972	0.166	0.166	0.225	0.223	0.216	0.733	0.223	0.166	Lm1 540			
B	0.028 0.028	0.224	0.242	0.147	0.122	0.227	0.234	0.224	0.733	0.373	0.164	Autombx: Once Calibrate: On			
	0.156 0.158	0.201	0.203	0.352	0.331	0.230	0.277	0.223	0.748	0.376	0.202	Plate Last Read: 11:31 AM 5/27/2010			
C	0.156 0.158	0.201	0.203	0.352	0.331	0.230	0.277	0.223	0.748	0.376	0.202				
	0.276 0.276	0.176	0.160	1.034	1.054	0.235	0.163	0.214	0.237	0.417	0.161				
D	0.276 0.276	0.176	0.160	1.034	1.054	0.235	0.163	0.214	0.237	0.417	0.161				
	0.390 0.393	0.167	0.164	0.333	0.341	0.251	0.354	0.189	0.288	0.169	0.165				
E	0.390 0.393	0.167	0.164	0.333	0.341	0.251	0.354	0.189	0.288	0.169	0.165				
	0.516 0.504	0.123	0.161	0.344	0.333	0.241	0.333	0.272	0.244	0.183	0.211				
F	0.516 0.504	0.123	0.161	0.344	0.333	0.241	0.333	0.272	0.244	0.183	0.211				
	0.648 0.641	0.138	0.133	0.233	0.233	0.148	0.341	0.240	0.188	0.170	0.203				
G	0.648 0.641	0.138	0.133	0.233	0.233	0.148	0.341	0.240	0.188	0.170	0.203				
	0.781 0.788	0.145	0.145	0.302	0.303	0.183	0.221	0.237	0.205	0.167	0.232				
H	0.781 0.788	0.145	0.145	0.302	0.303	0.183	0.221	0.237	0.205	0.167	0.232				
	0.781 0.768	0.145	0.145	0.302	0.303	0.183	0.221	0.237	0.205	0.167	0.232				

Wavelength Combination: !Lm1
Data Mode: Absorbance
Plate Blank Used Lm1 = 0.034

6/8/2010 11:57:14 AM

pen ibu kuni NO 270510 iii.pda
Copyright © 2001 Molecular Devices Corp. All rights reserved.

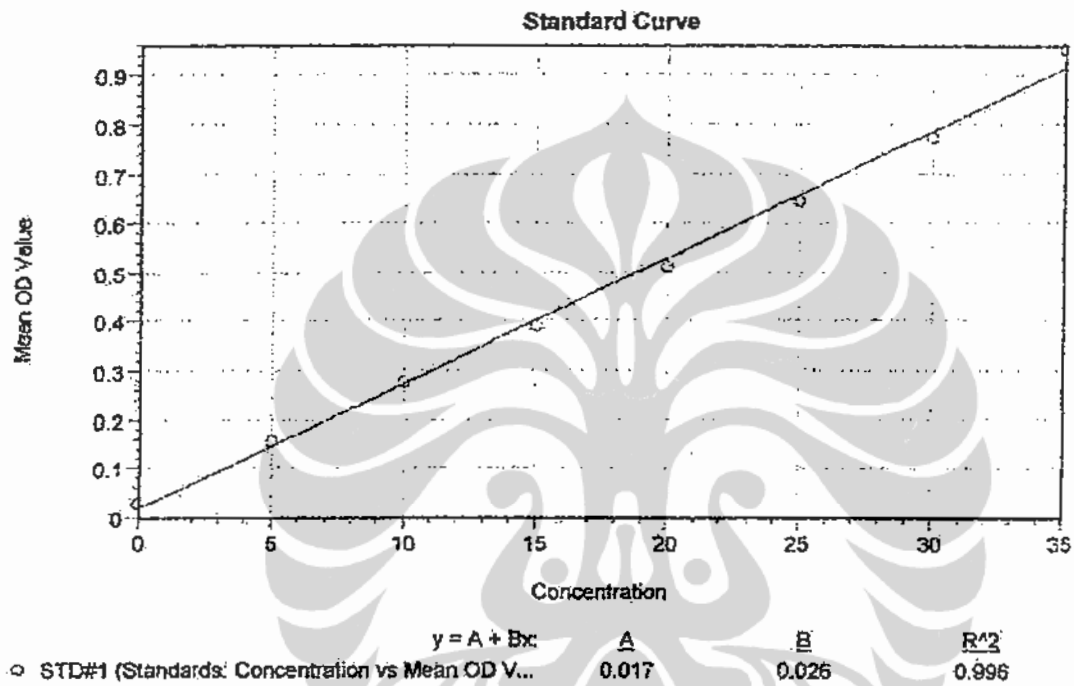
1



LAMPIRAN 6

Kurva Standar

NO BU KUNI 270510



6/8/2010 12:02:32 PM

pen ibu kuni NO 270510 iii.pda
Copyright © 2001 Molecular Devices Corp. All rights reserved.



LAMPIRAN 7

Hasil Pemeriksaan Standar μM

NO BU KUNI 270510

Standards (μM)

Sample	Concentration	Back Calc Conc	Wells	OD Values	Mean OD Value	Std. Dev.	CV%
Std1	0.000	0.445	B1	0.029	0.028	0.001	2.5
		0.408	B2	0.028			
Std2	5.000	5.391	C1	0.156	0.157	0.001	0.9
		5.466	C2	0.158			
Std3	10.000	10.065	D1	0.276	0.276	0.000	0.0
		10.065	D2	0.276			
Std4	15.000	14.506	E1	0.390	0.391	0.002	0.5
		14.623	E2	0.393			
Std5	20.000	19.433	F1	0.516	0.510	0.008	1.7
		19.946	F2	0.504			
Std6	25.000	24.555	G1	0.648	0.644	0.005	0.8
		24.282	G2	0.641			
Std7	30.000	29.735	H1	0.781	0.774	0.009	1.2
		29.229	H2	0.768			
Std8	35.000	35.895	A3	0.934	0.853	0.027	2.8
		37.175	A4	0.972			

6/8/2010 12:01:29 PM

pen ibu kuni NO 270510 iii.pda
Copyright © 2001 Molecular Devices Corp. All rights reserved.

1



LAMPIRAN 8

Hasil Pemeriksaan Kadar NO Resmi dari Makmal Terpadu Imunoendokrinologi



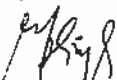
MAKMAL TERPADU IMUNOENDOKRINOLOGI
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA
WHO Laboratory No. 104 for Matched Reagent Programme
and No. 21 Zone B for External Quality Control
Jalan Salemba Raya No. 6, Jakarta 10430 Indonesia
Tel. (021) 3101733, Fax. 62-21-3103272



HASIL PENELITIAN NO IBU KUNI

NO	NAMA	0 MENIT (uM)	30 MENIT (uM)	60 MENIT (uM)	90 MENIT (uM)
1	056	33.672	22.336	34.026	34.592
2	049	19.926	17.802	18.864	21.414
3	051	21.344	23.894	21.556	20.776
4	055	134.774	121.1	119.330	116.708
5	025	15.613		14.483	12.496
6	022	9.185		8.719	9.419
7	020	9.926		12.068	9.108
8	044	76.765		79.959	77.699
9	048	25.116		21.533	22.312
10	019	16.080		16.586	19.546
11	062	21.610		18.184	16.144
12	067	44.006		10.160	13.898
13	061	41.788		40.152	40.774
14	071	15.224		16.080	15.846
15	065	16.392		15.300	14.132
16	066	19.820		17.326	17.092
17	034	56.120		59.860	56.744
18	028	19.430		21.066	17.638
19	035	16.002		13.276	14.600
20	036	27.688		27.920	31.114
21	018	11.796		13.354	12.574
22	057	11.796		11.406	13.198
23	032	14.366		13.510	13.042
24	040	15.068		14.678	16.704

Jakarta 1 juni 2010


(dr. Eva Zakiyah)



LAMPIRAN 9

Keterangan Lolos Kaji 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 : 61 /PT02.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 reseach, has carefully reviewed the proposal entitled:

"Pengaruh Aged Garlic Extract Terhadap Peningkatan Kadar Nitric Oxide Dalam Darah Subyek Laki-laki Hiper Reaktor Usia 20-30 Tahun".

Peneliti Utama : Kuni Purwani,SKp
Name of the Principal Investigator

Nama Institusi : Program Studi Ilmu Biomedik FKUI

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

Jakarta, 10 Mei 2010.....



Chairman
Ketua

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

-Peneliti wajib menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian.



LAMPIRAN 10

Surat Ijin Melakukan Pemeriksaan NO di Makmal Terpadu Imunoendokrinologi FK UI



MAKMAL TERPADU IMUNOENDOKRINOLOGI
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA
WHO Laboratory No. 104 for Matched Reagent Programme
and No. 21 Zone B for External Quality Control
Jalan Salemba Raya No. 6, Jakarta 10430 Indonesia
Tel. (021) 3101733, Fax. 62-21-3103272



Jakarta, 16 April 2010

No : 1017/MTIE-FKUI/Lab/IV/2010
Perihal : Penelitian

Kepada Yth.
dr. Nurhadi Ibrahim, PhD
Ketua Program Studi Biomedik
Kekhususan Fisiologi
Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
Jakarta

Dengan hormat,

Menjawab surat Saudara Nomor: 14/P3S/FS/I/2010 tertanggal 7 April 2010, perihal permohonan ijin melakukan pemeriksaan Nitric Oxide melalui Plasma, sehubungan dengan penelitian peserta program pendidikan S2 Biomedik: Kuni Purwani, SKp.

Bersama ini disampaikan bahwa kami mengizinkan perihal tersebut. Untuk informasi selanjutnya dapat menghubungi dra. Eva Zakiyah pada hari dan jam kerja.

Demikian disampaikan, atas perhatiannya kami ucapkan terima kasih.

Ketua
Makmal Terpadu Imunoendokrinologi
Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

Prof. dr. Endy M. Moegni, SpOG(K)
NIP. 130 366 433

Tembusan:
1. Kuni Purwani, SKp.
2. Arsip



LAMPIRAN 11

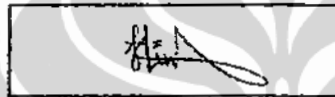
Formulir Persetujuan

Formulir Persetujuan

Semua penjelasan di atas telah disampaikan kepada saya dan semua pertanyaan saya telah dijawab oleh peneliti. Saya mengerti bahwa bila masih memerlukan penjelasan, saya akan mendapat jawaban dari Kuni Purwani.

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

Tandatangan pasien/subjek :



Tanggal : 10 / 5 / 2010

(Nama jelas : ..Supriyati.....)

Tandatangan saksi :



(Nama jelas : ..Ruyal da.....)



LAMPIRAN 12

Riwayat Hidup

Nama lengkap : Kuni Purwani, Skp
NPM : 0706170873
Alamat : Jl. Jatimakmur 12 RT 004/ RW 07
Pondok Gede – Bekasi, 17413
Umur/Kelamin/Agama : 60 tahun/ Perempuan/ Islam
Tempat/Tanggal lahir : Mojokerto, 16 November 1950
Asal Instansi : Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Binawan
Alamat Instansi : Jl. Kali Bata Raya No. 25 – 30. Jakarta Timur



Riwayat pendidikan

1. Akademi Keperawatan Depkes RI, Jakarta Lulus tahun 1972
2. Fakultas Ilmu Keperawatan Universitas Indonesia Lulus tahun 1998
3. Universitas Jakarta – Akta mengajar V Lulus tahun 1998
4. Kekhususan Fisiologi Program Studi Ilmu Biomedik 2008 – Sekarang
Program Pasca Sarjana Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

Riwayat pekerjaan

1. Staf pengajar di STIKes Binawan (2005 – sekarang)
2. Pembantu Ketua I Bidang Akademik PSIK – STIKes Binawan (2003 – 2005)
3. Wakil Ketua I Panitia Pengelola D3 Keperawatan Program Khusus RSUD
Kota Bekasi pada Akper Pajajaran Bandung (2001 – 2002)
4. Direktur Akademi Keperawatan As-Syafi'iyah (2001 – 2003)
5. Pudir I Akper As-Syafi'iyah – UIA (1999 – 2001)
6. Ka. Bid. Praktek Lapangan Akper As-Syafiiyah – UIA (1994 – 1997)
7. Ka. Ruangan Bag. Kamar Bedah Jantung RSCM (1974 – 1977)
8. Perawat Bag. Kamar Bedah Jantung RSCM (1972 – 1974)

Jakarta, Juni 2010

Kuni Purwani, SKp



LAMPIRAN 13

Draft Artikel

Draft Artikel Majalah Kedokteran Indonesia

Pengaruh Aged Garlic Extract terhadap peningkatan kadar Nitric Oxide dalam darah subyek laki-laki hiper-reaktor usia 20 – 30 tahun

Kuni Purwani[#], Tomi Hardjatno^{*}, Saptawati Bardosono[□]

* Departemen Fisiologi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

□ Departemen Nutrisi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Binawan

Latar belakang: *Aged garlic extract* adalah bawang putih yang telah direndam didalam ethanol 15-20% selama 20 bulan pada suhu kamar sehingga zat aktif didalam bawang putih mentah berubah menjadi komponen sulfur yang mudah larut dalam air, yaitu S-allylcysteine (SAC), dan S-allylmercaptocysteine. *Aged garlic extract* dapat meningkatkan produksi *nitric oxide*, karena S-allylcysteine dapat memicu masuknya kalsium kedalam sel endotel, selanjutnya merangsang *endothelial nitric oxide synthase* memproduksi *nitric oxide*. *Nitric oxide* yang telah dibentuk akan segera berdifusi kedalam sel otot polos yang berdekatan serta mengaktifkan beberapa mekanisme yang akan menyebabkan otot polos relaksasi dan tonus pembuluh darah menurun. *Cold Pressor Test* adalah suatu standar tes untuk memprediksi orang yang normotensi kelak akan mengidap hipertensi jika hasil tesnya masuk kedalam kategori hiper-reaktor, karena orang hiper-reaktor terjadi hipersensitivitas pada sistem saraf simpatisnya dan gangguan pada pembentukan *nitric oxide* sebagai vasodilator di pembuluh darah. Bila aged garlic extract dapat meningkatkan kadar nitric oxide maka tonus pembuluh darah pada orang hiper-reaktor dapat dijaga agar tidak meningkat ketika terjadi vasokonstriksi

Tujuan: Mengetahui efek *aged garlic extract* pada proses peningkatan kadar *nitric oxide* dalam darah subyek laki-laki hiper reaktor usia 20-30 tahun

Metode: Mendapatkan sampel hiper-reaktor dengan melakukan uji *cold pressor test* pada subyek laki-laki yang berumur 20 – 30 tahun. 10 Subyek diberi *aged garlic extract* 1200 mg per oral, 10 subyek diberi plasebo, kemudian dilakukan pemeriksaan kadar *nitric oxide* sebelum perlakuan, sesudah 60' perlakuan dan 90' perlakuan menggunakan *Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay* yang dikeluarkan oleh *Cayman Chemical Company*.

Hasil: Kadar *nitric oxide* sesudah pemberian *aged garlic extract* terlihat lebih tinggi daripada sebelumnya, namun secara statistik tidak berbeda bermakna ($p > 0,05$). Demikian juga nilai *nitric oxide* sebelum dan sesudah perlakuan pada masing-masing kelompok antara dua kelompok, tidak berbeda bermakna untuk $\Delta 60'$ ($p > 0,05$) dan $\Delta 90'$ ($p > 0,05$). Selanjutnya dilakukan uji untuk melihat apakah nilai *nitric oxide* dari waktu ke waktu tersebut berbeda antara kelompok perlakuan dengan kelompok plasebo, didapatkan hasil ($p > 0.05$), dan nilai *nitric*



oxide dari waktu ke waktu tersebut tidak ada kaitannya dengan beda perlakuan ($p > 0,05$).

Kesimpulan: Sediaan *aged garlic extract* sebanyak 1200 mg yang diberikan per oral kepada manusia cenderung meningkatkan kadar *nitric oxide*, namun secara statistik tidak berbeda bermakna.

Kata kunci: aged garlic extract, nitric oxide, hiper-reaktor

The effect of Aged Garlic Extract to the increase level of Nitric Oxide within blood of hyper-reactor men aged between 20 -30 years

Kuni Purwani[#], Tomi Hardjatno*, Saptawati Bardosono[□]

* Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Indonesia

□ Departement Nutrition, Faculty of Medicine, University of Indonesia

Binawan Institute of Health Science

Introduction: *Aged garlic extract* derives from garlic that has been remained in 15-20% ethanol for 20 months at room temperature so that the active substance in garlic changes into sulfur component that is water-soluble, S-allylcysteine (SAC), and S-allylmercaptocysteine. *Aged garlic extract* increase the production of Nitric Oxide (NO), this is happen because SAC stimulate the entry of calcium into endothelial cell, furthermore stimulate endothelial nitric oxide synthase to produce NO. Nitric Oxide that has been formed diffuses immediately into neighboring smooth muscle and activates several mechanisms that cause smooth muscle relaxation and decrease vascular tone. *Cold Pressure Test* is a standard test to predict whether a person with normotension is at risk to become hypertension if the test results fallen into hyper-reactor category. Hyper-reactor people have sympathetic nerves hypersensitivity and alteration in the production of NO as vasodilator. If *Aged garlic extract* is able to increase NO level, then vascular tone in a hyper-reactor person can be maintained not to increase when vasoconstriction occur.

Objective: Knowing the effects of *aged garlic extract* to the increase level of Nitric Oxide within blood of hyper-reactor men aged between 20 -30 years.

Method: Acquiring the sample by performing cold pressure test to men subject aged between 20-30 years old. Ten subjects were given 1200 mg of aged garlic extract per oral and ten other subjects were given the placebo. Then, an examination been done to check the value of NO level before treatment, 60' after treatment, and 90' after treatment using *Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay* produced by *Cayman Chemical Company*.

Result: The value of nitric oxide (NO) level after aged garlic extract were given is higher than before, but statistically does not shown significant difference ($p > 0.05$). Both does the value of NO level before and after treatment in each group, between two groups shows no significant difference at $\Delta 60'$ ($p > 0.05$) and $\Delta 90'$ ($p > 0.05$). Furthermore, a test been done to observe whether the value of NO level from time to time were different between the treatment and the placebo group, the result is $p > 0.05$. In addition, the value of NO level from time to time had nothing to do with the different treatment ($p > 0.05$).



Conclusion: The preparation of 1200 mg aged garlic extract that was given orally to human tends to increase the level of NO, although statistically the increase is not significantly different.

Keywords: aged garlic extract, nitric oxide, hyper-reactor

Pendahuluan

Penyakit kardiovaskular adalah penyakit yang kompleks dan multifaktorial dengan berbagai faktor penyebabnya. Kerusakan dinding pembuluh darah, hiperlipidemia, dan hipertensi mempunyai korelasi positif terhadap terjadinya gangguan kardiovaskular, dan faktor risiko utama pada gangguan kardiovaskular adalah hipertensi (Sensus Kesehatan Rumah Tangga (SKRT), 2001) Hipertensi kini menjadi masalah global karena prevalensi yang terus meningkat sejalan dengan perubahan gaya hidup seperti merokok, obesitas, inaktivitas fisik, dan stres psikososial. Hampir di setiap negara, hipertensi menduduki peringkat pertama sebagai penyakit yang paling sering dijumpai.

Data WHO tahun 2000 menunjukkan, di seluruh dunia, sekitar 972 juta orang atau 26,4% penghuni bumi mengidap hipertensi dengan perbandingan 26,6% pria dan 26,1% wanita. Diperkirakan angka ini kemungkinan akan meningkat menjadi 29,2% di tahun 2025. Dari 972 juta pengidap hipertensi, 333 juta berada di negara maju dan 639 juta sisanya berada di negara sedang berkembang, termasuk Indonesia. Menurut hasil Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) tahun 2007, prevalensi hipertensi di Indonesia sementara mencapai 31,7 persen dari populasi penduduk berusia 18 tahun ke atas. Dari jumlah tersebut, 60 persen di antaranya berakhir menjadi stroke dan sisanya berakhir dengan gangguan jantung, gagal ginjal, dan kebutaan. Data penelitian Departemen Kesehatan RI menunjukkan hipertensi dan penyakit kardiovaskular cenderung meningkat seiring dengan gaya hidup yang jauh dari perilaku hidup sehat selain itu mahalnya biaya pengobatan hipertensi dan kurangnya sarana dan prasarana penanggulangan hipertensi. Pemaparan hipertensi dengan penyebab yang tidak diketahui atau *essential hypertension* merupakan 90% dari kasus hipertensi. Banyak Faktor yang menjadi penyebab terjadinya hipertensi esensial ini, diantaranya adalah peningkatan aktivitas sistem saraf simpatis dan adanya defisiensi vasodilator seperti *nitric oxide* (NO) yang kemudian akan memberi dampak pada tonus pembuluh darah.¹

Untuk memprediksi kemungkinan terjadinya penyakit hipertensi pada orang dengan tekanan darah normal, dapat dilakukan pengujian, yang dikenal sebagai *Cold pressor test* (CPT) yang digunakan untuk mengukur respon tekanan darah terhadap stimulus rasa dingin eksternal. CPT telah dikenal lama sebagai pemeriksaan standar untuk mengetahui karakteristik fungsi saraf simpatis, dimana bila hasil uji terjadi peningkatan tekanan darah maka dapat diambil kesimpulan bahwa orang yang bersangkutan mempunyai aktivitas simpatis yang meningkat (Nakamura, 2008). Orang yang mempunyai sensitivitas tinggi terhadap sistem saraf simpatis akan mudah terjadi konstriksi pada pembuluh darahnya dan bila pembentukan nitric oxide menurun akan berakibat tidak terpeliharanya tonus pembuluh darah, yang lambat laun akan memicu terjadinya hipertensi.^{1,2} Usaha agar vasokonstriksi menetap tidak terjadi, adalah dengan meningkatkan respon



vasodilatasi pada pembuluh darah. Agar respon vasodilatasi menjadi lebih efektif, maka perlu dipikirkan bahan yang dapat membantu terjadinya respon vasodilatasi tersebut menjadi lebih efektif.

Garlic atau bawang putih (*Allium Sativum*), khususnya sediaan *aged garlic extract* (AGE) dapat memberi efek anti-hyperlipidemia, anti-oxidative dan memberikan perlindungan terhadap kardiovaskular dengan kemampuannya meningkatkan kadar fisiologis *nitric oxide*. *Nitric oxide* yang dikenal pula sebagai *Endothelial Derived Relaxing Factor* (EDRF), merupakan vasodilator kuat, diproduksi didalam lapisan endotel dan pembentukannya tergantung kepada jumlah kalsium didalam sel endotel.^{1,2,3} Pada penelitian yang dilakukan pada hewan percobaan *Male ddY mice* yang diberi AGE (2,86 gr/ kg berat badan) per oral, kemudian diperiksa produksi *nitric oxide* dalam plasma pada 15, 30, dan 60 menit setelah pemberian. Hasil pemeriksaan memperlihatkan kenaikan kadar *nitric oxide* dalam plasma sebanyak 44% pada 15 menit, 37% pada 30 menit dan 44% pada 60 menit.⁴ Pada penelitian terhadap orang dengan tekanan darah sistolik ≥ 140 mmHg, tekanan darah diastolik ≥ 90 mmHg yang diberi *aged garlic extract* 2 kali sehari sebanyak 1200 mg sekali minum selama 12 minggu menunjukkan penurunan tekanan darah sistolik sebesar 8,38 mmHg dan tekanan darah diastolik sebesar 7,27 mmHg.⁵

Berdasarkan hasil penelitian tersebut, menarik untuk diteliti apakah pemberian *aged garlic extract* sebanyak 1200 mg dapat memberikan efek peningkatan *nitric oxide* setelah 60 menit dan 90 menit pemberian, pada orang yang pada uji *cold pressor test* termasuk kategori hiperreaktor.

Metode

Penelitian ini merupakan uji klinik acak tersamar ganda dengan 2 kelompok paralel, menguji pengaruh pemberian *aged garlic extract* (AGE) terhadap perubahan nilai *Nitric Oxide* (NO) pada subyek laki-laki hiper-reaktor. Kedua kelompok menggunakan subyek hiper-reaktor, kelompok perlakuan diberi *aged garlic extract* 1200 mg per oral dan kelompok plasebo diberi plasebo. Sebelum pemberian *aged garlic extract* atau plasebo seluruh subyek diperiksa kadar *nitric oxide* darah. Setelah menit ke 60 dan menit ke 90 pemberian *aged garlic extract* diperiksa kembali kadar *nitric oxide* darahnya. Pemeriksaan kadar *nitric oxide* menggunakan *Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit Catalog No 780001* yang dikeluarkan oleh *Cayman Chemical Company*. Sediaan dibaca menggunakan spectrophotometry dengan panjang gelombang 540 nm.

Hasil

Hasil pemeriksaan kadar *nitric oxide* baik pada sebelum perlakuan maupun sesudah perlakuan pada menit ke 60 maupun menit ke 90, setelah dilakukan analisis univariat dalam hal ini menggunakan uji *Saphiro Wilk* karena jumlah sampel dibawah 30, mendapatkan hasil bahwa data berdistribusi tidak normal, maka dilakukan penghitungan nilai median dengan nilai minimum dan maksimum, Hasil pemeriksaan kadar *nitric oxide* sebelum perlakuan, dan 60 menit serta 90 menit sesudah perlakuan pada kedua kelompok ditampilkan dalam nilai median, setelah dibuat grafik terlihat bahwa cenderung terjadi peningkatan kadar *nitric oxide* sesudah perlakuan pada kelompok AGE, pada kelompok plasebo kecenderungannya adalah menurun dan fluktuatif. Interpretasi hasil



adalah ada kecenderungan peningkatan kadar nitric oxide pada kelompok AGE sesudah diberikan perlakuan. Akan tetapi setelah dilakukan penghitungan statistik, untuk pemeriksaan kadar nitric oxide sebelum dan sesudah perlakuan antara kedua kelompok berdistribusi tidak normal maka dilakukan uji Mann Withney U, didapatkan hasil penghitungan nilai kemaknaan (nilai p) sebelum perlakuan $p = 0,912$; 60 menit sesudah perlakuan $p = 0,912$; 90 menit sesudah perlakuan $p = 1,000$. Interpretasi dari hasil tersebut adalah bahwa peningkatan kadar *nitric oxide* sebelum pemberian dan sesudah pemberian *aged garlic extract* antara kedua kelompok tidak memperlihatkan perbedaan bermakna.

Untuk data perbedaan nilai *nitric oxide* sebelum dan sesudah perlakuan pada masing-masing kelompok antara dua kelompok berdistribusi normal, maka dilakukan uji t tidak berpasangan dengan nilai $p = 0,970$ untuk Δ 60 menit dan $p = 0,953$ untuk Δ 90 menit. Interpretasi hasil data tersebut adalah perbedaan peningkatan kadar nitric oxide sebelum dan sesudah perlakuan tidak memperlihatkan perbedaan bermakna.

Selanjutnya dilakukan analisis multi variat untuk melihat efek *aged garlic extract* pada beberapa kali pengukuran berulang kadar *nitric oxide*, dibandingkan antara kelompok perlakuan dengan kelompok plasebo dengan menggunakan uji *multiple - measures*. Hasil nilai kemaknaannya adalah $p = 0,904$ untuk nilai *nitric oxide* dari waktu ke waktu dan $p = 0,995$ untuk melihat apakah nilai *nitric oxide* dari waktu ke waktu tersebut berbeda antara kelompok perlakuan dengan kelompok plasebo. Interpretasi hasil data tersebut adalah, nilai *nitric oxide* dari waktu ke waktu tidak berbeda bermakna dan nilai *nitric oxide* dari waktu ke waktu tersebut tidak ada kaitannya dengan beda perlakuan.

Kesimpulan

Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa sediaan *aged garlic extract* sebanyak 1200 mg yang diberikan per oral kepada manusia cenderung meningkatkan kadar *nitric oxide* darah sesudah 60' dan 90' dibandingkan dengan kelompok yang diberi plasebo, akan tetapi setelah dilakukan penghitungan statistik peningkatan kadar *nitric oxide* sesudah 60' dan 90' pemberian *aged garlic extract* ataupun plasebo dibandingkan dengan kadar *nitric oxide* sebelum pemberian *aged garlic extract* ataupun plasebo pada kedua kelompok menjadi tidak berbeda bermakna.

Peningkatan kadar *nitric oxide* setelah 60' dan 90' pemberian plasebo dibandingkan dengan sebelum pemberian pada kelompok plasebo cenderung menurun dan fluktuatif, setelah dilakukan penghitungan statistik peningkatan kadar *nitric oxide* sesudah 60' dan 90' pemberian plasebo dibandingkan kadar *nitric oxide* sebelum diberi plasebo tidak berbeda bermakna.

Peningkatan kadar *nitric oxide* setelah 60' dan 90' pemberian *aged garlic extract* dibandingkan dengan sebelum pemberian *aged garlic extract* cenderung meningkat, Namun setelah dilakukan penghitungan statistik peningkatan kadar *nitric oxide* sesudah 60' dan 90' pemberian *aged garlic extract* dibanding dengan sebelum pemberian tidak berbeda bermakna

Daftar Pustaka



1. Chatterjee A., Catravas J.D. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascul Pharmacol*; 49 (4-6): 134 – 140. doi: 10.1016/j.vph.2008.
2. Michael SK, Surks HK, Wang Y, Blanton R, Jamnongjit M, Aronovitz M, et al. High blood pressure arising from a defect in vascular function. Molecular Cardiology Research Institute, Tufts University School of medicine Boston; 2008 March.
3. Kansui Y., Garland C.J., Dora K.A. Enhanced spontaneous Ca^{2+} in endothelial cells reflect signaling through myoendothelial gap junctions in pressurized mesenteric arteries. *Cell Calcium*; 44(2): 135 – 146. doi: 10.1016/j.ceca.2008.
4. Morihara N, Sumioka I, Moriguchi T, Uda N, Kyo E. Aged garlic extract maintains cardiovascular homeostasis in mice and rats 1,2. *The journal of nutrition*. Bethesda. 136(3S): 777-81. 2006 March.
5. Ried K., Frank O.R., Stocks N.P., Fakler P. Sullivan T. Effect of garlic on blood pressure: A systematic review and meta-analysis. *BMC Cardiovascular Disorder* 8: 13 doi:10.1186/1471-2261-8-13; 2008.
6. Mc Cance KL, Huether SE. *Pathophysiology : the biologic basis for disease in adults and children*. 5th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier mosby; 2006.
7. Lilly L.S. *Pathophysiology of Heart Disease*; 4th ed. Lippincot Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business; 2007.
8. Oparil S., Zaman A., David A., Calhoun. *Pathogenesis of Hypertension*. *AnnIntern Med*; 139: 761 – 776. 2003.
9. Levy M.N., Pappano A.J. *Cardiovascular Physiology*. 9th ed Mosby, Inc., an affiliate of Elsevier Inc; copyright © 2007.
10. Mohrman D.E., Heller L.J. *Cardiovascular Physiology*. 6th ed. The Mc Grow-Hills companies. 2006.
11. Guyton A.C., Hall J.E. *Textbook of Medical Physiology*. 11th ed. Elsevier Saunders. 2006.
12. Silverthorn D.U. *Human physiology: an integrated approach*. 4th ed. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings. 2007.
13. Chen J. et al. (Collaborative Reseach Group). Association between Blood Pressure Responses to Cold Pressor Test and Dietary Sodium Intervention in the Chinese Population. *Arch Intern Med*; 168(16):1740 – 1746. doi:10.1001/archinte.168.16.1740; 2008.
14. Delaney P.E., Young C.N. DiSabatino A., Stillabower M.E. Farquhar W.B. limb venous tone and responsiveness in hypertensive humans. Department of Health, Nutrition, and Exercise sciences, University of Delaware, Newark-Delaware. 2008.
15. Colman RW, Clowes AW, Goldhaber SZ, Marder VJ, George JN. *Hemostasis and thrombosis : Basic principles and clinical practice*. 5th ed. Philadelphia, USA: Lippincot Williams & Wilkins; 2006.
16. Dudzinski D.M., Michael T. Live history of eNOS: Partners and pathways. *Cardiovascular research* 25; 247 – 260. 2007.
17. Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. Nitric oxide synthases: struktur, function and inhibition. *Biochem.J*. 357, 593 – 615. 2001.



18. Frank P.G., Lisanti M.P. Role of caveolin- 1 in the regulation of the vascular shear stress response. *J.Clin Invest*, 116: 1222 – 1225. doi: 1172/JCI 28509. 2006.
19. Smith C, Marks A, Lieberman M. *Basic medical biochemistry : a clinical approach*. 2nd ed. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
20. Govers R, Rabelink T.J. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol* 280: F193-F206. 2001.
21. Fleming I., Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284: R1 –R12, 10.1052/ajpregu. 00323. 2002.
22. Gratton J.P., Bernatchez P., Sessa W.C. Caveolae and caveolins in the cardiovascular system. *American Heart Association*. Doi: 10.1161/01.RES.0000129178.56294.17 . 2004.
23. Nakamura T., Kawabe K., Sapru H.N. Cold pressor test in the rat: medullary and spinal pathways and neurotransmitters. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295(4): H1780-H1787 . 2008.
24. Wood D.L., Sheps S.G., El Veback L.R. Cold pressor test as a predictor of hypertension. *Hypertension*; 6:301-306. [PubMed: 6735451]. 1984.
25. Blumenthal M, Wollschlaeger B. *The ABC clinical guide to herbs*. 1st ed. Austin, Texas: American botanical council; 2003.
26. Rahman K, Lowe GM. Garlic and cardiovascular disease: A critical review. *American society for nutrition J.nutr.Bethesda.*; 136: 736-40. 2006.
27. Park K.S., Ku D.D. Garlic elicits a nitric oxide-dependent relaxation and inhibits hypoxic pulmonary vasoconstriction in rats. (journal). *Clinical experiment pharmacol physiol*. 2000.
28. Banerjee SK, Maulik SK. Effect of Garlic on Cardiovascular Disorder; a review. *Nutritional Journal*.last updated 2007 September; doi: 10.1186/1475-2891: 1-4.
29. Lawson L.D., Gardner C.D. Composition, Stability, and Bioavailability of Garlic Products Being Used in a Clinical Trial. *J Agric Food Chem*; 53(16): 6254-6261. doi: 10.1021/jf 050536+. 2005.
30. Sun X., Ku D.D. Allicin in garlic protects against coronary endothelial dysfunction and right heart hypertrophy in pulmonary hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H2431-H2438. 2006.
31. Duda G., Suliburska J., Musialik D.P. effects of short-term garlic supplementation on lipid metabolism and antioxidants status in hypertensive adults. *Pharmacological Reports* 60, 163 – 170 ISSN 1734-1140. 2008.
32. Cruz C., Rotter Correa R.,Gonzales S. Et al. Renoprotective and antihypertensive effects of S-allylcysteine in 5/6 nephrectomized rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 293: F1691-F 1698. 2007.
33. Sastroasmoro S.,Ismael S. *Dasar-Dasar Metodologi Penelitian Klinis edisi ke-2*. CV Sagung Seto. 2006.
34. Sugiyono. *Metode Penelitian Kuantitatif, Kualitatif, dan R&D*. Cetakan kesatu. Penerbit Alfabeta, Bandung. 2006.
35. Harauma A., Moriguchi T. Aged Garlic Extract Improves Blood pressure in Spontaneously Hypertensive Rats More Safely than Raw Garlic. *American Society for Nutrition J.Nutr* 136: 769S-773S. 2006.

