

**PENGARUH VITAMIN C TERHADAP VIABILITAS SEL ENDOTEL DAN
DISFUNGSI ENDOTEL PADA KULTUR HUVECs YANG DIPAPAR CdCl₂
MELALUI NO DAN MDA**

TESIS

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister**



oleh:
KRISTIANNINGRUM DIAN SOFIANA
156070100111003

**PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK
MINAT FISILOGI KEDOKTERAN**

**PROGRAM PASCASARJANA FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**



TESIS


PENGARUH VITAMIN C TERHADAP VIABILITAS SEL ENDOTEL DAN DISFUNGSI ENDOTEL PADA KULTUR HUVECs YANG DIPAPAR $CdCl_2$ MELALUI NO DAN MDA


Oleh:

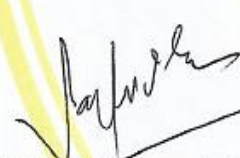
Kristianningrum Dian Sofiana, dr.

Dipertahankan di depan penguji
pada tanggal : 16 Januari 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat


Komisi Pembimbing,


Prof. dr. Moch. Aris Widodo, MS., SpFK., Ph.D.
Ketua


Dr. Husnul Khotimah Ssi, M. Kes
Anggota



dr. Mohammad Saifurrohman, SpJP.(K), Ph.D.
Penguji 1

Penguji,


dr. Hidayat Sujuti, SpM., Ph.D
Penguji 2

Malang,
Universitas Brawijaya
Dekan,




Dr. dr. Sri Andarini, M. Kes
NIP. 195804141987012001

PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam Naskah TESIS ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak ada karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah TESIS ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur PLAGIASI, saya bersedia TESIS ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (MAGISTER) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku. (UU NO.20 Tahun 2003, Pasal 25 ayat 2 dan pasal 70)

Malang, 16 Januari 2018



Nama : Kristianningrum Dian Sofiana, dr.
NIM : 156070100111003
PS : Ilmu Biomedik
Prog. : Pascasarjana
Fak : Kedokteran UB

IDENTITAS TIM PENGUJI

JUDUL TESIS: PENGARUH VITAMIN C TERHADAP VIABILITAS SEL ENDOTEL DAN DISFUNGSI ENDOTEL PADA KULTUR HUVECs YANG DIPAPAR CdCl₂ MELALUI NO DAN MDA

Nama Mahasiswa : Kristianningrum Dian Sofiana
 NIM : 156070100111003
 Program Studi : Magister Ilmu Biomedik
 Minat : Fisiologi Kedokteran

KOMISI PEMBIMBING

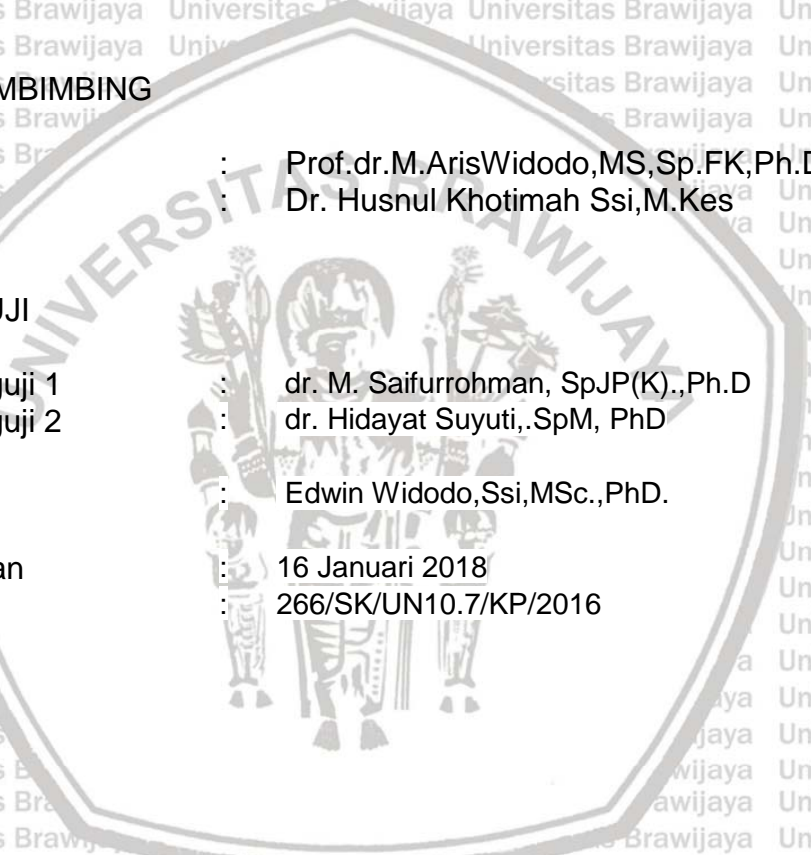
Ketua : Prof.dr.M.ArisWidodo,MS,Sp.FK,Ph.D
 Anggota : Dr. Husnul Khotimah Ssi,M.Kes

TIM PENGUJI

Dosen Penguji 1 : dr. M. Saifurrohman, SpJP(K),Ph.D
 Dosen Penguji 2 : dr. Hidayat Suyuti,SpM, PhD

Monev : Edwin Widodo,Ssi,MSc.,PhD.

Tanggal Ujian : 16 Januari 2018
 SK Ujian : 266/SK/UN10.7/KP/2016



Riwayat Hidup

Kristianningrum Dian Sofiana, lahir di Malang 6 September 1986, putri dari Bapak Jilan SH dan Ibu Sukemi SST.SH.MMKes. Lulus SDN Dinoyo 6 tahun 1998, lulus SLTP Negeri 3 Malang tahun 2001, dan lulus SMU Negeri 3 Malang tahun 2004. Tahun 2005 melanjutkan pendidikan pada jenjang S1 di Fakultas Kedokteran Universitas Sam Ratulangi Manado, lulus tahun 2009. Tahun 2009 melanjutkan pendidikan profesi dokter di universitas yang sama, dan lulus pada awal tahun 2011. Pada tahun 2015 mengambil Program Magister Biomedik di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Tahun 2013 sampai sekarang bekerja sebagai dosen Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Menikah dengan Mokhammad Bahrul Huda SH.MH dan dikaruniai seorang putra.



KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT atas segala rahmat dan curahan nikmat yang telah diberikan-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan tesis yang berjudul **“PENGARUH VITAMIN C TERHADAP VIABILITAS SEL ENDOTEL DAN DISFUNGSI ENDOTEL PADA KULTUR HUVECs YANG DIPAPAR CdCl₂ MELALUI NO DAN MDA”**.

Begitu banyak dukungan dan perhatian yang penulis dapatkan selama penelitian dan penyusunan tesis ini berlangsung, sehingga hambatan yang ada dapat dilalui dan dihadapi dengan lancar. Oleh karena itu, dengan penuh kerendahan hati, penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada

1. Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberikan kesempatan menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. dr. Hidayat Suyuti, PhD.SpM., selaku Ketua Program Magister Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberi kesempatan menuntut ilmu sekaligus sebagai penguji kedua SHP yang telah memberikan banyak masukan dan saran dalam penyusunan tesis.
3. Prof. dr. M. Aris Widodo, MS., Sp.FK., Ph.D., sebagai pembimbing pertama yang telah memberikan bimbingan sejak proses awal pembuatan proposal, penelitian hingga penyusunan tesis ini selesai.
4. Dr. Husnul Khotimah Ssi, M.Kes sebagai pembimbing kedua yang telah memberikan bimbingan, saran, dan masukan, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan tesis.
5. dr. Saifurrohman, SpJP., Ph.D sebagai penguji pertama yang saran dan masukannya sangat saya perlukan guna perbaikan penyusunan tesis ini.

6. Dr. dr. Siti Candra Windu Baktiyani, SpOG.(K) (Almarhum). Yang menjadi penguji kedua proposal tesis.Smoga Allah mencatat sebagai amal ibadah beliau.
7. Agustina Tri Endharti Ssi,PhD sebagai penguji kedua tesis yang saran dan masukannya saya perlukan dalam perbaikan penyusunan tesis ini.
8. Segenap anggota tim pengelola Tesis Pasca Sarjana Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
9. Seluruh tenaga pengajar Program Studi Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
10. Secara khusus penghargaan, rasa hormat, dan terima kasih yang tak terhingga penulis persembahkan kepada Mama Emi, Papa Jilan, Buya Maskhun, Umi azizah, Suamiku M.B. Huda, Anakku Isa ,Adek adekku (Yunda,Dimas,Kiki,Risma,Niken) dan keluarga besar yang selalu mendukung dan memberikan segenap perhatiannya.
11. Teman-teman terbaik Provisia Marthalita Yuning Wulan,Resha,Maria dan teman teman dari Biomedik angkatan 2015 yang telah menemani, membantu, menyemangati, dan mendoakan sehingga proposal ini dapat terselesaikan
12. Rumah Sakit Bersalin Permata Bunda yang menjadi tempat pengambilan sampel penelitian beserta Bidan ,Perawat dan seluruh staf yang membantu.
13. Staf Biomedis, Mas Yudha dan Mbak Bunga terima kasih atas bantuan tekhnis dan non tekhnis

Penulis mengetahui bahwa penulisan proposal tesis ini masih memiliki banyak kekurangan, oleh sebab itu kritik dan saran yang bersifat membangun dari pembaca sangat diperlukan demi kesempurnaan karya tulis ini. Penulis berharap tesis ini dapat bermanfaat bagi pembaca

Malang, 10 Januari 2018

Penulis

Ringkasan

Kristianningrum Dian Sofiana, NIM 156070100111003. Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang,. Pengaruh Vitamin C Terhadap Viabilitas Sel Endotel dan Disfungsi Endotel Pada Kultur HUVECs yang Dipapar CdCl_2 Melalui NO dan MDA. Komisi Pembimbing Ketua: Prof.dr.M.ArisWidodo,MS,Sp.FK,Ph.D, Anggota: Dr. Husnula Khotimah Ssi,M.Kes.

Penyebab kematian tertinggi di dunia disebabkan oleh penyakit kardiovaskuler yang diawali dengan terjadinya disfungsi endotel. Beberapa studi mengungkapkan ada kaitan antara logam berat kadmium dengan kelainan vaskular. Kadmium logam berat yang mudah mengkontaminasi lingkungan dengan sumber paparan melalui bahan bakar minyak, kosmetik, pupuk, produksi baja, rokok dan inecerator. Kadmium memasuki tubuh melalui inhalasi dari asap rokok, udara yang makanan dan minuman yang tercemar kadmium. Beberapa efek kadmium terhadap kesehatan antara lain menyebabkan kanker, penyakit ginjal, penyakit saluran nafas, tulang dan otot. Penelitian terbaru secara epidemiologi menemukan kaitan antara kadar kdmium dalam serum darah maupun urin dengan kejadian penyakit vaskular. Kadmium menyebabkan stres oksidatif dengan beberapa mekanisme antara lain melalui reaksi fenton, menghambat kompleks mitokondria, dan menurunkan antioksidan intraselular. Stress Oksidatif meningkatkan ROS (Reaktif Oksigen Species), radikal Hydroxil yang bereaksi dengan lipid tak jenuh akan menghasilkan peroksidasi lipid dengan hasil sekunder malondialdehid (MDA). Superoxide bereaksi dengan NO (Nitrit Oxide) membentuk peroxynitrit yang akan menurunkan kadar NO. Radikal Oksigen juga mempengaruhi transkripsi dari DNA yang mengakibatkan penurunan viabilitas sel. Vitamin C bersifat antioksidan yang bersifat larut air, mudah ditemukan pada berbagai jenis buah buahan dan memiliki fungsi enzimatik maupun non enzimatik. Beberapa studi menunjukkan Vitamin C berperan dalam fungsi vaskular diantaranya memodulasi vasorelaksasi dengan meningkatkan sintesis atau bioavailabilitas NO melalui ascorbate mediated denitrosylation dan fosforilasi eNOS. Peranan lainnya mengatur transkripsi yang mengkode protein termasuk angiogenesis dan proliferasi sel. Sebagai antioksidan vitamin ini memiliki kemampuan mereduksi atau radikal scavenger pada beberapa radikal bebas dan ROS yang patologis. Gugus enadiol yang terletak pada atom C2 dan C3 pada Vitamin C menyebabkan mampu menangkap radikal hidroksil. Sedangkan untuk radikal bebas oksigen ditangkap dengan atau tanpa bantuan enzim katalisator. Penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh dari vitamin C pada viabilitas sel endotel dan Disfungsi Endotel melalui kadar NO dan MDA HUVECs (Human Umbilical Vein Endhotel Cells) yang diinduksi CdCl_2

Penelitian ini menggunakan HUVECs konfluen 70% yang dibagi dalam lima kelompok perlakuan yaitu: kontrol, paparan CdCl_2 , dan kelompok paparan CdCl_2 (24,154 $\mu\text{g/L}$) yang ditambahkan Vitamin C 50, 100, 200 μM secara berurutan. Viabilitas sel dianalisis menggunakan MTT assay, Kadar NO diukur dengan Greiss reagen, sedangkan MDA sel diukur dengan menggunakan metode TBARS.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa viabilitas sel endotel mengalami peningkatan dengan penambahan Vitamin C konsentrasi 100 dan 200 μM . Penambahan Vitamin C cenderung meningkatkan kadar NO dibanding dengan kelompok CdCl_2 meskipun tidak berbeda signifikan. Kadar MDA HUVECs mengalami penurunan pada pemberian Vitamin C konsentrasi 50 dan 100 μM , sedangkan konsentrasi 200 μM meningkatkan kadar MDA. Dapat Disimpulkan bahwa Vitamin C konsentrasi 100 μM mampu meningkatkan viabilitas sel, kadar No dan menurunkan kadar MDA.

Keywords: HUVECs, Cadmium, Vitamin C, Viabilitas sel, NO, MDA



SUMMARY

Kristianningrum Dian Sofiana, Student ID Number 156070100111003. Magister Program of Biomedical Science Faculty of Medicine Brawijaya University Malang. The Effect of Vitamin C on Endothelial Cell Viability and Endothelial Dysfunction in HUVECs Culture Exposed to CdCl₂ Through NO and MDA. Chairman Commission: Prof. dr. M. Aris Widodo, MS, Sp. FK, Ph.D, Member: Dr. Husnul Khotimah, S.si, M.Kes.

The highest cause of death in the world is caused by cardiovascular disease that begins with the occurrence of endothelial dysfunction. Several studies revealed that there is a link between heavy metal such as cadmium with vascular abnormalities. Cadmium is a heavy metal substance that easily contaminates the environment through fuel oil, cosmetics, fertilizers, steel production, cigarettes and incinerators as its exposure source. Cadmium enters the body through inhalation of smoke from cigarette, air or food and drink that contaminate with cadmium. Some cadmium effects on health include cancer, kidney disease, and respiratory diseases, bones and muscles disease. Recent epidemiological studies have found a link between cadmium levels in both serum and urine with the incidence of vascular disease. Cadmium causes oxidative stress with several mechanisms, such as through fenton reactions, inhibiting mitochondrial complexes, and decreasing intracellular antioxidants. Oxidative Stress increases ROS (Reactive Oxygen Species). Hydroxyl radical is one of the examples of ROS that if it reacts with unsaturated lipids will produce lipid peroxidation with malondialdehyd (MDA) as the secondary results. Superoxide that reacts with NO (Nitric Oxide) will form peroxynitrite that might lower the NO levels. Oxygen radical also affects the transcription of DNA and resulting in decreased cell viability. Vitamin C is a water-soluble antioxidant, a vitamin that's easy to find in various types of fruits and has both enzymatic and non enzymatic functions. Several studies have shown that Vitamin C plays a role in vascular function including modifying vasorelaxation by increasing NO synthesis or NO's bioavailability through ascorbate mediated denitrosylation and eNOS phosphorylation. Another role of Vitamin C is to regulate the transcription that encodes proteins including angiogenesis and cell proliferation. As an antioxidant, this vitamin has the ability to reduce or become a radical scavenger in some free radicals and pathological ROS. The enadiol group located on C2 and C3 at Vitamin C lead the vitamin to have the ability to capture hydroxyl radicals. Meanwhile, free radicals of oxygen are captured with or without the support from catalytic enzymes. This research is meant to find out the effect of vitamin C on endothelial cell viability and endothelial dysfunction through NO levels and MDA in HUVECs (Human Umbilical Vein Endhotel Cells) induced by CdCl₂.

This research used 70% of confluent HUVECs divided into five treatment groups: control group, CdCl₂-exposed group, and CdCl₂-exposed group (24,154 µg/L) added with Vitamin C 50,100, and 200 µM respectively. Cell viability was analyzed using an MTT assay, NO content was measured with Greiss reagents, whereas MDA cells were measured using the TBARS method.

The research results showed that endothelial cell viability increased with the addition of Vitamin C concentrations of 100 and 200 µM. The addition of Vitamin C tended to increase NO levels compared to the CdCl₂ group although it didn't show significant difference. The MDA levels of HUVECs were decreased in the allotment of Vitamin C in 50 and 100 µM concentrations. Meanwhile, 200 µM of Vitamin C concentrations of increased the MDA levels. It can be concluded that 100 µM concentration of Vitamin C is be able to increase the cell viability and NO levels, and decrease the MDA levels.

Keywords: HUVECs, Cadmium, Vitamin C, Cell Viability, NO, MDA



DAFTAR ISI

Halaman Judul.....	i
Halaman Pengesahan.....	ii
Lembar Orisinalitas.....	iii
Identitas Tim Penguji.....	iv
Kata Pengantar.....	v
Ringkasan.....	vii
Summary.....	viii
Daftar Isi.....	ix
Daftar Gambar.....	xii
Daftar Tabel.....	xiii
Daftar Singkatan.....	xiv
Daftar Lampiran.....	xvi

BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.3.1 Tujuan Umum.....	5
1.3.2 Tujuan Khusus.....	6
1.4 Manfaat Penelitian.....	6
1.4.1 Manfaat Akademik.....	6
1.4.2 Manfaat Praktis.....	6

BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Kadmium.....	7
2.1.1 Struktur Kimia.....	7
2.1.2 Gambaran Umum.....	7
2.1.3 Metabolisme Kadmium.....	9
2.1.4 Toksisitas Kadmium.....	12
2.2 Disfungsi Endotel.....	15
2.2.1 Endotel.....	15
2.2.2 Definisi Disfungsi Endotel.....	17
2.2.3 Mekanisme Disfungsi Endotel.....	17
2.2.4 Perkembangan Disfungsi Endotel Menjadi Aterosklerosis.....	20
2.3 Nitrat Oksida.....	21
2.4 Stress Oksidatif.....	23
2.4.1 Sumber dan Reaksi ROS.....	24
2.4.2 Biomarker Stress Oksidatif.....	25
2.4.3 Proses Peroksidasi Lipid.....	27
2.5 Vitamin C.....	29

2.5.1	Vitamin C sebagai Antioksidan	30
2.5.2	Vitamin C dan Disfungsi Endotel	31
BAB III KERANGKA KONSEP dan HIPOTESIS.....		32
3.1	Kerangka Konsep	32
3.2	Hipotesis Penelitian	34
BAB IV METODE PENELITIAN.....		35
4.1	Jenis Rancangan	35
4.2	Lokasi dan Waktu Penelitian	35
4.3	Populasi dan Sampel Penelitian	35
4.3.1	Populasi Penelitian	35
4.3.2	Kriteria dan Sampel Penelitian	35
4.3.3	Pengambilan Sampel	36
4.4	Variabel Penelitian	37
4.4.1	Variabel Bebas	37
4.4.2	Variabel Terikat	37
4.5	Batasan Operasional	38
4.6	Bahan dan Alat Penelitian	39
4.6.1	Sampel, Alat dan Bahan Kultur HUVECs	39
4.6.2	Instrumen Kultur HUVECs	40
4.7	Prosedur Kerja	40
4.7.1	Pembuatan Larutan HEPES	40
4.7.2	Pembuatan Larutan Bicarbonat Phenol Red	40
4.7.3	Pembuatan Medium Cord Solution	40
4.7.4	Pembuatan Larutan Penicilin Streptomycine (Pen-step)	40
4.7.5	Pembuatan Larutan Glutamine	41
4.7.6	Pembuatan Medium Serum Free	41
4.7.7	Pembuatan Medium Kultur	41
4.7.8	Pembuatan Larutan Collagenase	41
4.7.9	Pembuatan Larutan Buffer HEPES 100 cc	41
4.7.10	Pengambilan Umbilikus	41
4.7.11	Isolasi dan Pembuatan Kultur Sel Endotel (HUVECs)	42
4.7.12	Induksi CdCl ₂ pada Kultur HUVECs	43
4.7.13	Pemberian Vitamin C	43
4.7.14	Pengukuran Aktivitas Nitrit Okside	43
4.7.15	Pemeriksaan MDA.....	44
4.7.15.1	Persiapan sampel.....	45
4.7.15.2	Prosedur Pemeriksaan kalorimetrik.....	45
4.7.16	Pemeriksaan Viabilitas Sel	46
4.8	Rancangan Analisis Data.....	47
BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA		49
5.1	Karakteristik Sampel.....	49
5.2	Hasil Kultur Sel Endotel Tali Pusat.....	49
5.3	Pengaruh CdCl ₂ terhadap Morfologi Sel Endotel HUVECs.....	50
5.4	Pengaruh CdCl ₂ terhadap Viabilitas Sel Endotel HUVECs.....	51
5.5	Pengaruh vitamin C terhadap rata-rata viabilitas sel endotel pada HUVECS yang diinduksi oleh CdCl ₂	52

5.6	Pengaruh pemberian vitamin C pada kadar NO HUVECS yang diinduksi oleh CdCl ₂	54
5.7	Pengaruh vitamin C pada kadar MDA HUVECS yang diinduksi oleh CdCl ₂	56
BAB VI PEMBAHASAN.....		59
6.1	Pengaruh kadmium.....	59
6.2	Pengaruh kadmium terhadap morfologi sel endotel.....	59
6.3	Pengaruh kadmium terhadap viabilitas sel.....	60
6.4	Pengaruh kadmium terhadap kadar NO.....	61
6.5	Pengaruh kadmium terhadap kadar MDA.....	62
6.6	Pengaruh vitamin C terhadap viabilitas sel HUVECS yang diinduksi CdCl ₂	62
6.7	Pengaruh vitamin C terhadap kadar NO HUVECS yang diinduksi CdCl ₂	63
6.8	Pengaruh vitamin C terhadap kadar MDA HUVECS yang diinduksi CdCl ₂	63
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN.....		65
7.1	Kesimpulan.....	65
7.2	Saran.....	65
DAFTAR PUSTAKA		66
Lampiran		76



DAFTAR GAMBAR

2.1	Mekanisme Transportasi Cd ke Dalam Sel	12
2.2	Peran Cd dalam Menginduksi ROS	15
2.3	ROS dan RNS	19
2.4	Sintesis NO, Mekanisme Kerja dan Efek Fisiologi	22
2.5	eNOS Couple dan Uncouple	22
2.6	Reaksi Fenton dan Heber Weis	27
2.7	Proses Peroksidasi Lipid	29
2.8	Struktur Vitamin C	30
2.9	Penyerapan Seluler Vitamin C dan Bentuk Oksidasi DHA	30
5.1	Pengamatan Kultur Sel Endotel.....	49
5.2	Pengamatan Morfologi Sel Endotel Yang Dipapar CdCl ₂	50
5.3	Pengukuran Viabilitas pada Kultur HUVECs yang diinduksi Berbagai Konsentrasi CdCl ₂	51
5.4	Pengukuran Viabilitas Sel .Pengaruh Vitamin C pada HUVECs yang diinduksi CdCl ₂	52
5.5	Pengukuran Kadar NO .Pengaruh Vitamin C pada HUVECs yang diinduksi CdCl ₂	54
5.6	Pengukuran Kadar MDA .Pengaruh Vitamin C pada HUVECs yang diinduksi CdCl ₂	56



DAFTAR TABEL

2.1	Faktor Faktor Vasoaktif Yang Dilepaskan Sel Endotel.....	16
4.1	Pembagian kelompok kultur.....	36



DAFTAR SINGKATAN

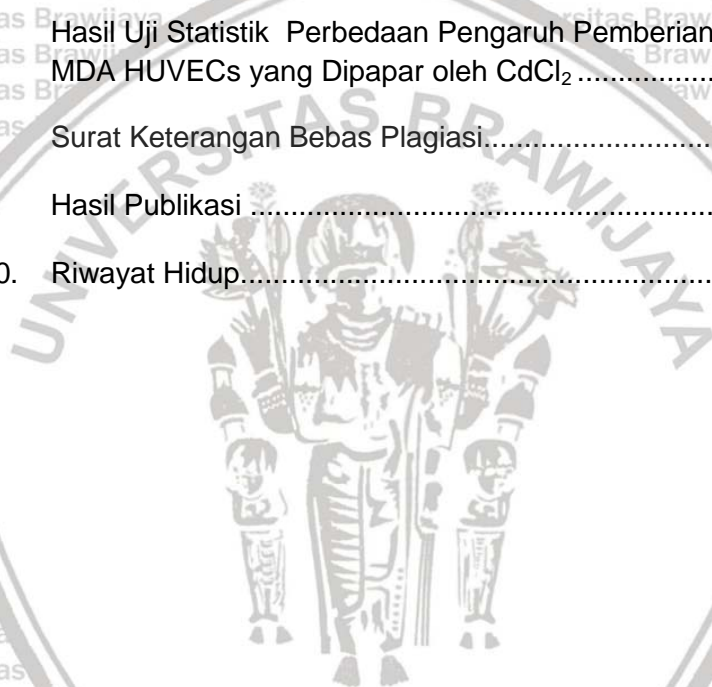
- BH4 : Tetrahydrobiopterin
- Ca : Calcium
- Cd : Cadmium
- CdCl₂ : Cadmium chloride
- CDPKs : Calcium Dependen Protein Kinase
- COPD : Chronic obstructive pulmonary disease
- COX : Cyclooxygenase
- CVD : Cardio Vascular Disease
- DHA : docosahexaenoic aci
- DM : Diabetes Melitus
- DMT1 : Divalent Metal Transporter 1
- DNA : Deoxyribonucleic acid
- EDHF : endothelium-derived hyperpolarizing factor
- EDRF : Endothelium-derived relaxing factor
- eNOS : Endothelial nitric oxide synthase
- ET-1 : Endotelin-1
- GLUT : Glucose transporter
- GPx : Glutathione Peroksidse
- GSH : Glutation
- H₂O₂ : Hidrogen Peroksida
- HUVECs : Human Umbilical Vein Endothelial Cells
- ICAM-1 : Intercellular Adhesion Molecule 1
- IL-1 : Interleukin 1
- IL-6 : Interleukin 6
- iNOS : inducible nitric oxide synthase
- IP3 : Inositol trisphosphate
- L : Lipid Radikal
- LOOH : Lipid Hidroksiperoksida
- MAPKs : Mitogen Activated Protein Konase
- MCP : Monocyte chemotactic protein-
- MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein-1
- MDA : Malondialdehyde
- MTP1 : Metal Transporter 1
- MTT : 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 Diphenyltetrazolium Bromide
- NfKB : nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
- NHANES : National Health and Nutrition Examination Survey
- nNOS : Neuronal Nitric oxide synthases
- NO : Nitric Oxide
- O₂⁻ : Superoksida
- OH[•] : Radikal Hidroksil
- ONOO⁻ : Peroxynitrit
- PG1 : Prostatiklin
- PI-3-Kinase : Phosphatidilinositol 3 kinase
- PUFA : Polyunsaturated fatty acids
- RNS : Reactive nitrogen species

- ROS : Reactive Oksigen species
- SOD : Superoxide dismutase
- SVCT : sodium-dependent vitamin C transporter
- TNF α : tumor necrosis factor
- VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule 1
- VSCM : Vascular Smooth Muscle cell
- XO : Xantin Oksida
- ZTL1 : zinc transporter



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Keterangan Kelaikan Etik	76
Lampiran 2.	Penjelasan Untuk Mengikuti Penelitian.....	77
Lampiran 3.	LD 50 CdCl ₂	80
Lampiran 4.	Hasil Uji Statistik Perbedaan Pengaruh Pemberian Kadmium terhadap Viabilitas Sel Endotel pada HUVECs yang Dipapar oleh CdCl ₂	81
Lampiran 5.	Hasil Uji Statistik Perbedaan Pengaruh Pemberian Vitamin C terhadap Viabilitas Sel Endotel pada HUVECs yang Dipapar oleh CdCl ₂	84
Lampiran 6.	Hasil Uji Statistik Perbedaan Pengaruh Pemberian Vitamin C terhadap Kadar NO HUVECs yang Dipapar oleh CdCl ₂	88
Lampiran 7.	Hasil Uji Statistik Perbedaan Pengaruh Pemberian Vitamin C terhadap MDA HUVECs yang Dipapar oleh CdCl ₂	90
Lampiran 8.	Surat Keterangan Bebas Plagiasi.....	92
Lampiran 9.	Hasil Publikasi	93
Lampiran 10.	Riwayat Hidup.....	94



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit kardiovaskuler menyebabkan kematian nomor satu di dunia. Menurut WHO pada tahun 2012 diperkirakan 17,5 juta meninggal karena penyakit kardiovaskuler yakni sekitar 37%. Menurut studi kohort Telezz –Plaza dan Borne *et al* ditemukan adanya asosiasi peningkatan CVD dengan peningkatan kadmium didalam tubuh. Penelitian yang dilakukan Tellez Plaza *et al* yang dipublikasikan pada tahun 2013 menyebutkan pada geometrik mean dengan level kadmium pada urin 0,94 μ g/g (95% dengan interval 0,92-0,93) ditemukan 1084 kejadian CVD dengan 400 kematian. Data penelitian kohort di Swedia juga mengungkapkan bahwa kadar kadmium di dalam darah pada level kuartil 4 (0,98 μ g/l) paparan kadmium dosis rendah berasosiasi dengan kejadian gagal jantung (Borne, *et al.*,2015). Menurut penelitian yang dilakukan oleh Lee *et al.*,2010 dengan mengambil data dari Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES) ditemukan data rata rata kadmium darah 1,53 μ g/l memiliki potensi terjadinya Infark Heart Disease (IHD) dan hipertensi. Aterosklerosis merupakan penyebab utama dari penyakit kardiovaskuler. Aterosklerosis merupakan gangguan metabolik sebagai respon terhadap suatu proses radang kronis dengan pembentukan plak pada dinding arteri yang dimulai pada awal masa kehidupan yang bersifat progresif dan asimtomatis. Beberapa faktor penyebab aterosklerosis adalah penambahan usia, kebiasaan merokok, diabetes melitus (DM), hiperlipidemia dan hipertensi (Tokgozoglu & Kaya, 2008; NHLBI.NIH (National Heart, Lung, Blood Institute, 2016). Aterosklerosis merupakan penyakit pada arteri sedang dan besar yang bersifat fibroproliferatif dan imunoinflamasi kronis. Sel otot polos intima, sel endotel dan leukosit

berperan dalam teori molekuler dan seluler penyakit. Pembentukan aterosklerosis melalui fase awal atau inisiasi yaitu rekrutmen leukosit menuju intima sel otot polos endotel. Selanjutnya Fase progresi dimana terjadi respon inflamasi disertai dengan fibroproliferatif. Terakhir, fase komplikasi, yaitu ketika plak yang dihasilkan menyumbat aliran darah pada pembuluh darah dan menyebabkan cedera iskemik pada miokardium (Singh, 2012).

Penyakit vaskuler seperti aterosklerosis, CVD, Hypertensi, Diabetes Melitus, Penyakit Ginjal diawali dari disfungsi endotel. Disfungsi endotel ditandai dengan gangguan homeostasis sel endotel, penurunan antioksidan, antitrombotik, dan antiinflamasi dan peningkatan molekul adhesi. Penanda khas disfungsi endotel ini adalah menurunnya kadar Nitrit Oxide (NO) (Mudau, *et al.*, 2012). NO terbentuk dari L-arginine melalui enzim NO syntase menyebabkan relaksasi pembuluh darah, menghambat adhesi dan agregasi trombosit. Ada beberapa faktor yang menyebabkan terjadinya disfungsi endotel ini antara lain hiperkolestroleemia, hiperglikemia, hipertensi, obesitas, merokok dan pajanan logam berat antara lain arsen, timbal, merkuri, dan kadmium (Alissa & Ferns, 2011).

Kadmium merupakan logam berat yang toksik dan dapat merusak sistem organ manusia. Kadmium mudah mengkontaminasi manusia dan lingkungan hidup dengan sumber utama dari asap rokok, pengelasan serta makanan dan minuman yang telah terkontaminasi (Bernhoft, 2013). Kadmium merupakan logam berat yang terletak diantara zink (Zn) dan merkuri (Hg) pada tabel unsur periodik kimia dengan sifat kimia yang lebih mirip Zn. Kadmium biasanya membentuk ikatan kation divalen dengan unsur yang lain misalnya saja $CdCl_2$. Logam berat berjumlah 0,1 persatu juta di kerak bumi (Wedhepol, 1995). Pemanfaat logam kadmium secara komersil digunakan dalam pembuatan laser, baterai, pewarna cat, pewarna kosmetik, pembuatan baja dan juga dalam bidang nuklir (U. S.

Geological Survey,2012). Kadmium bisa mengkontaminasi melalui inhalasi maupun oral (WHO,2010), dan ini bisa menyebabkan masalah kesehatan jangka panjang (Abernethy, *et al.*, 2010).

Stres oksidatif diduga sebagai penyebab dari disfungsi endotel. Dalam hal ini stress oksidatif dapat dipicu dengan induksi kadmium.Kadmium memicu *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) secara tidak langsung dengan melepaskan logam aktif redoks sehingga meningkatkan konsentrasi ion besi yang tak terikat akhirnya terjadi stress oksidatif melalui reaksi fenton. (Casalino, *et al.*,1997; Weisberg, *et al.*,2003).

ROS mengakibatkan kerusakan pada lipid. ROS yang mempengaruhi lipid adalah radikal Hidroksil dan Hydroperoksil. Radikal hydroksil berukuran kecil, mobile dan mudah larut didalam air, dan merupakan hasil metabolit ROS yang paling reaktif. Peroksidasi lipid merupakan reaksi oksigen dengan lipid tak jenuh yang menghasilkan berbagai produk oksidasi, dengan produk utama hidroperoksida lipid (LOOH) dan dengan produk sekunder malondialdehide (MDA). MDA menunjukkan produk oksidasi asam lemak tidak jenuh oleh radikal bebas. MDA merupakan dekomposisi asam arachidonat dan PUFA melalui reaksi enzimatik maupun non enzimatik. Peningkatan stres oksidatif sesuai dengan peningkatan pembentukan MDA. MDA merupakan biomarker stres oksidatif yang juga berkaitan dengan kondisi patologis. (Cuypers, *et al.*,2010; Ayala, *et al.*,2014)

Viabilitas sel merupakan perbandingan jumlah sel yang hidup dan total sel yang ada yang dinyatakan dalam prosentase.Pada kasus disfungsi endotel,sel banyak yang mengalami kematian/apoptosis yang disebabkan oleh ROS dengan mempengaruhi faktor transkripsi sehingga mengalami kerusakan DNA yang berakibat pada apotosis maupun dari pengaruh peroxynitrit yang merupakan hasil dari eNOS uncouple.pemeriksaan viabilitas sel ini

menggunakan 3-,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (Aziz *et al.*,2015)

ROS juga mempegaruhi kadar NO pada disfungsi endotel, superoksida produksi dari ROS akibat paparan Cd bereaksi dengan NO membentuk OONO (peroxynitrit) yang menyebabkan menurunnya kadar NO yang dihasilkan oleh eNOS viabilitas mengalami penurunan (Sena, *et al.*,2013).

Vitamin C dengan struktur enam karbon lakton, bersifat hidrofilik merupakan antioksidan nonenzimatik utama yang berfungsi sebagai free radikal scavenger dan molekul oksidatif seperti hydroxyl radikal (OH⁻), Superoxide anion (O₂⁻) (Renugadevi & Prabu, 2010). Penelitian toksisitas kadmium pada tikus jantan fischer (F344/NRC) yang diinduksi kadmium (25µmol CdCl₂/kg, *Sub Cutan*(SC) dalam 72 jam terbukti mematikan tetapi dengan pemberian Vitamin C dengan dosis 2 g/kg, SC dalam waktu 1,12,24 jam dapat mencegah efek letal dari kadmium (Shiraishi,1993). Kadmium dosis 10 mg/kgBB yang diterapi Vitamin C 1,5 mg/L dapat menurunkan absorpsi kadmium pada organ hati, ginjal, testis dan otot (Groncki, 2004)

Vitamin C disebut sebagai antioksidan karena mendonasikan elektron dan mencegah komponennya teroksidasi. Ketika Vitamin C mendonasikan elektron maka akan kehilangan secara sequential. Bentuk setelah kehilangan satu elektron menjadi free radikal, semidehydroascorbic acid atau disebut ascorbic radikal. Dibandingkan free radikal yang lainnya ascorbic radikal sifatnya lebih stabil dan tidak reaktif, karena sifat inilah yang menyebabkan free radikal dapat berinteraksi dengan askorbat. Reaktif free radikal ini direduksi dan berinteraksi dengan askorbat, reduksi dari radikal menjadi bentuk yang kurang reaktif disebut dengan free radikal scavending sehingga asam askorbat ini disebut dengan free radikal scavenger (Padayatty *et al.*,2003).

Pada tahun 2005 dilakukan penelitian epidemiologi dengan 1908 sampel berusia dua puluh tahun lebih dengan mengambil data kadar kadmium di dalam darah dan dikaitkan dengan penyakit kardiovaskular, dari penelitian tersebut didapatkan kadar rendah kadmium di dalam darah memiliki faktor resiko penyakit kardiovaskular (Lee, *et al.*, 2011). Kadmium mempromosikan stress oksidatif dan peroksidasi lipid (Yin, *et al.*, 1999). Vitamin C bermanfaat untuk membantu pasien dengan penyakit kardiovaskuler. Hal ini membuka peluang terapi antioksidan sebagai radical scavenger untuk mengatasi disfungsi endotel yang merupakan awal dari penyakit kardiovaskular. Vitamin C bekerja pada fase liquid di sitosol mencegah peroksidasi lipid dan melindungi sel dari efek ROS. Berdasar penelitian dilaporkan antioksidan Vitamin C dan Vitamin E dapat mencegah kerusakan struktur dan fungsi sintesa Nitric oxide (NO) pada kultur HUVEC'S yang dipapar kadar glukosa tinggi (Khotima, 2003).

Berdasarkan latar belakang tersebut penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek antioksidan Vitamin C pada HUVECs yang dipapar kadmium sebagai penyebab disfungsi endotel, dengan membuktikan efek Vitamin C terhadap Viabilitas sel, NO dan MDA.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah pemberian Vitamin C meningkatkan viabilitas sel endotel, kadar NO dan menurunkan MDA pada HUVEC yang dipapar oleh CdCl₂?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian Vitamin C terhadap viabilitas sel endotel, kadar NO, dan MDA pada kultur HUVEC yang dipapar oleh CdCl₂

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Untuk menghitung viabilitas sel endotel pada kultur HUVEC yang telah diberi Vitamin C (50,100,200 μM) dan dipapar CdCl_2 dengan konsentrasi 24,154 $\mu\text{g/l}$
2. Untuk menentukan kadar NO pada kultur HUVEC yang telah diberi Vitamin C (50,100,200 μM) dan dipapar CdCl_2 dengan konsentrasi 24,154 $\mu\text{g/l}$
3. Untuk menghitung kadar MDA pada kultur HUVEC yang telah diberi Vitamin C (50,100,200 μM) dan dipapar CdCl_2 dengan konsentrasi 24,154 $\mu\text{g/l}$

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademis

Manfaat akademis dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mendapatkan bukti ilmiah dan pengetahuan baru mengenai pengaruh Vitamin C terhadap viabilitas sel, kadar NO dan kadar MDA, pada kultur HUVEC yang dipapar CdCl_2
2. Dasar untuk melakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh Vitamin C sebagai antioksidan yang berfungsi sebagai radikal scavenger akibat paparan CdCl_2 yang menyebabkan terjadinya disfungsi endotel.

1.4.2 Manfaat Praktis

Sebagai landasan ilmiah yang digunakan sebagai terapi preventif dan kuratif disfungsi endotel yang disebabkan oleh CdCl_2 .

BAB 2**TINJAUAN PUSTAKA****2.1 Kadmium****2.1.1 Struktur Kimia**

Kadmium (Cd) adalah elemen logam kelompok II B dari Tabel Periodik (nomor atom:48, dan relatif massa atom: 112, 41). Cd dalam berbentuk logam lembut putih perak dan biasanya di alam tidak berbentuk logam murni namun berikatan dengan ion lain seperti dalam kompleks sulfida, oksida, karbonat didalam biji seng, timah dan tembaga. Selain itu juga berbentuk dalam ikatan dengan klorida dan sulfat namun jarang dalam jumlah besar (UNEP, 2010).

2.1.2 Gambaran Umum

Kadmium (Cd) merupakan salah satu logam berat dalam sistem tabel periodik kimia. Cd berada diantara Zinc (Zn) dan Merkuri (Hg) dengan sifat kimia yang lebih mirip ke arah Zn. Umumnya berbentuk kation divalen dan berikatan dengan logam yang lainnya seperti $CdCl_2$. Logam ini bersifat racun dan sering digunakan dalam kehidupan sehari-hari. Logam ini digunakan untuk pembuatan baterai, pewarna pigmen, kosmetik, dan pembuatan baja (U. S Geological Survey, 2012). Cd berbahaya bagi lingkungan dan manusia. Cd berada pada atmosfer, air dan makanan yang terkontaminasi. Pada dosis tertentu Cd menyebabkan penyakit bahkan kematian. Sumber paparan Cd dari bahan bakar minyak, besi, produksi baja, sampah, inceneration, perokok dan pupuk. Erupsi dari gunung berapi dan penggunaan pupuk merupakan kontaminan Cd secara tidak langsung (Sharma, *et al.*, 2015).

Paparan Cd secara inhalasi pada pekerja industri baterai dalam waktu lama dan rendahnya Ca dan Vitamin D berpengaruh pada kehamilan dan menyusui. Paparan Cd pada dosis rendah akan menyebabkan proteinuria pada ginjal.

Interaksi antara Cd, Cu dan Zn menyebabkan intoksikasi Cd. Cd diabsorpsi pada organ dan jaringan hati, liver, pankreas, jantung, dan testis dengan masa paruh 10-30 tahun. Cd ini berbahaya dan mampu mengkontaminasi tanah, tanaman, udara, air dan hewan (Allisa & Ferns, 2011).

Paparan kadmium bisa terjadi melalui inhalasi maupun secara oral. Paparan Kadmium secara inhalasi terjadi pada perokok aktif maupun pasif, inhalasi juga terjadi pada pekerja industri peleburan, manufaktur baterai, solder, dan produksi pigmen (WHO,2010). Paparan kadmium secara oral melalui konsumsi makanan yang terkontaminasi (misalnya udang, daging, sayuran dari Zn / Cd pipa air yang tua atau dari polusi industri) dapat menyebabkan masalah kesehatan dalam jangka panjang (Abernethy, *et al.*,2010). Dari berbagai penelitian meyakini bahwa setiap hari 10 – 25 µg kadmium terdapat dalam makanan yang terkontaminasi. Dan makanan yang terkontaminasi sekitar 5 – 10 % diserap tubuh. Peyerapan oleh tubuh melalui usus semakin besar pada orang dengan defisiensi zat besi, kalsium ataupun zinc (Nordberg, *et al.*,2007). Inhalasi pada perokok aktif meningkatkan kadar kadmium secara signifikan didalam tubuh perokok. Satu batang rokok mengandung 1-2 mg kadmium yang mana 10% terhirup saat rokok dihisap (WHO,1992).

Banyak penelitian yang telah dilakukan untuk membuktikan efek kadmium bagi kesehatan. Paparan kadmium berasosiasi dengan kerusakan dan patah tulang, kerusakan ginjal dan penyebab kanker type tertentu. (Nordberg, *et al.*,2014). Paparan kadmium secara inhalasi menyebabkan pneumonitis, udem pulmonal dan COPD (WHO,2010). Studi epidemiologi terbaru menemukan asosiasi kadmium dengan Cardiovaskular Disease (CVD), Ada hubungan level Cd dalam udara dengan mortalitas yang disebabkan oleh CVD (Carrol,1966). Studi ekologi melaporkan adanya asosiasi antara Cd di jaringan dengan terjadinya lesi atherosklerosis (Aalbers, *et al.*,1985) Data terbaru dari NHANES melalui studi

kros sektional menunjukkan adanya asosiasi antara kadar Cd di darah dan urin dengan insiden dan mortalitas dari CVD, miokardum infeksi, stroke dan heart failure (Everett, *et al.*,2008; Menke, *et al.*,2009; Peters, *et al.*,2010; Telez-Plaza, *et al.*,2013).

2.1.3 Metabolisme Kadmium

2.1.3.1 Absorpsi

Absorpsi Cd melalui saluran nafas dan saluran pencernaan. Dari udara lebih kurang 5 -50% kadmium dihirup dan memasuki tubuh melalui paru paru. Cd yang mengkontaminasi air minum ataupun makanan 1-10%nya akan diserap tubuh apabila tubuh mengalami defisiensi zat besi. Setelah diabsorpsi Cd diangkut melalui ikatan group sulfhydryl yang terdiri dari protein seperti metallothionein. Sekitar 30 persen Cd disimpan di hati dan 30% lagi di ginjal. Masa paruh Cd berada didalam darah diperkirakan sekitar 75 sampai 128 hari namun bukan berarti bebas didalam tubuh sehingga darah, urin dan rambut bisa digunakan untuk memperkirakan kadar Cd didalam tubuh (ATSDR,2012; Bernhorf, 2013).

Beberapa hipotesis menjelaskan bagaimana Cd masuk kedalam sel. Hipotesis pertama adalah penyerapan Cd melibatkan interaksi dan persaingan antara Cd dan protein membran yang terlibat dalam transport elemen penting seperti Ca, Fe, dan Zn ke dalam epitel melalui mimikri. Hipotesis lain menyatakan bahwa Cd berkonjugat dengan tiol yang memiliki berat molekul rendah seperti GSH dan cys. Konjugat ini berfungsi sebagai homolog molekul atau meniru protein transporter yang diserap oleh asam amino, oligopeptida. Hipotesis yang cukup terkenal adalah endositosis dimana Cd masuk kedalam epitel dengan mengikat MT, albumin atau protein lainnya dengan membentuk konjugat yang berbentuk substrat (Zalups & Ahmad, 2002).

Divalent Metal Transporter (DMT1) dapat mengangkut Cd dalam enterosit.

Transporter ini berada didalam membran plasma luminal. DMT1 merupakan gabungan transporter proton yang terlibat dalam penyerapan ferrous non hem.

Ketika Cd mengikat DMT1, melalui bentuk homolog ionik atau "*mimikri*," itu diangkut ke dalam kompartemen sitosol enterosit. Temuan terbaru menunjukkan bahwa penyerapan luminal Cd juga dapat terjadi melalui salah satu pengangkut luminal seng (Zn). Salah satu transporter Zn yang mungkin terlibat dalam penyerapan Cd di lumen adalah ZTL1 (Bressler, *et al.*, 2004).

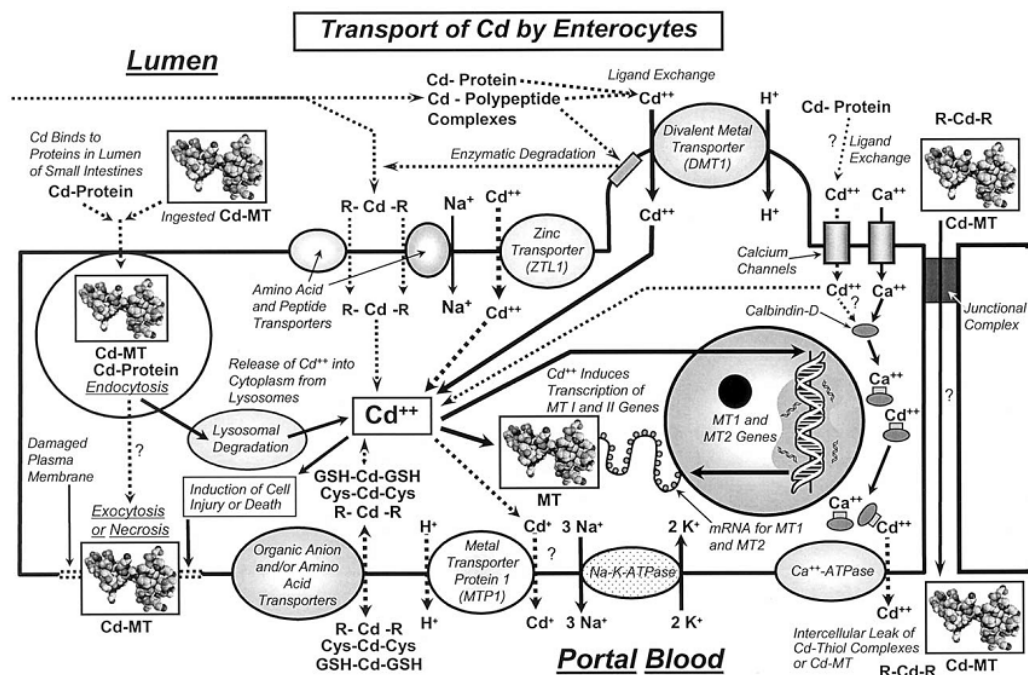
Kadmium (Cd) mengalami "kebocoran" dari kompartemen luminal ke dalam kompartemen basolateral melalui kompleks junctional ketika enterosit mengalami intoksikasi Cd. Chanel Kalsium (Ca) dapat berfungsi sebagai mekanisme tambahan akses masuknya ion ke lingkungan intraselular dari kompartemen luminal. Enterosit diketahui menanggapi bentuk biologis aktif Vitamin D, yaitu, 1,25-dihydroxycholecalciferol, dengan mempromosikan penyerapan Ca. Salah satu faktor yang terkait dengan penyerapan ini adalah sintesis calbindin-D, yang merupakan protein pengikatan kalsium yang membantu dalam luminal untuk pertukaran Ca di enterosit (Marchetti, 2013).

Beberapa Ca diserap pada membran luminal enterosit masuk melalui chanel Ca, dikirim ke membran basolateral oleh calbindin-D, dan diekspor dari enterocyte oleh ATPase Ca-yang teraktivasi. Dengan asumsi bahwa Cd dapat berfungsi sebagai homolog ionik atau meniru dari Ca (Bridges & Zalup, 2005).

Ion Cd masuk ke dalam enterosit melalui saluran Ca dan ditransfer ke membran basolateral oleh calbindin-D, di mana beberapa ion Cd dapat diekspor keluar dari enterocyte oleh satu atau lebih mekanisme terlibat dalam membran basolateral, termasuk Ca^{2+} ATPase. Bukti molekuler terbaru menunjukkan bahwa transporter Fe, homolog dengan DMT1, berada dalam membran plasma basolateral dari enterosit dan diyakini terlibat transportasi ekstraselular Fe di dalam sitosol.

Transporter ini telah disebut sebagai *Metal Transporter 1* (MTP1). Karena kedua Fe dan Cd tampaknya diangkut oleh DMT1, MTP1 juga dapat mengangkut ion Cd dari dalam kompartemen sitosol ke dalam kompartemen basolateral. Transporter asam amino dan transporter anion organik di basolateral juga mungkin transporter yang dapat mengangkut Cd baik ke dalam dan keluar dari enterosit pada membran basolateral. Sebagai pool intraselular Cd terakumulasi dalam enterosit, kolam ini dapat berinteraksi dengan berbagai komponen intraseluler dan kompartemen didalam sel (Zalups&Ahmad, 2002).

Beberapa ion Cd yang masuk ke dalam enterosit menginduksi transkripsi gen untuk MT-1 dan MT-2, dengan mekanisme yang belum sepenuhnya ditentukan. Peningkatan kandungan seluler dari hasil protein MT dari terjemahan dari peningkatan jumlah mRNA untuk MT-1 dan MT-2 yang diinduksi berikut paparan Cd. protein MT induksi berfungsi sebagai pool untuk mengikat beberapa Cd intraseluler, yang menghasilkan peningkatan retensi Cd dalam enterosit. Jika pool intraseluler meningkat Cd ditukar melampaui apa unsur-unsur pelindung dalam enterosit sehingga menginduksi stres oksidatif yang pada gilirannya dapat mengubah aktivitas pernapasan mitokondria dan menyebabkan peroksidasi lipid di membran plasma dan gangguan metabolisme lainnya di seluler (Liu, et al.,2009). Semua efek ini dapat menginduksi kematian sel dengan baik nekrosis atau apoptosis, yang menghasilkan pelepasan Cd (muchof yang dalam bentuk Cd-MT) dari dalam enterocyte. (Zalups&Ahmad,2003)



Gambar 2.1. Mekanisme transportasi Cd ke dalam sel

Transportasi Cd ke dalam sel secara endositosis yakni berikatan dengan Metallothionein (MT). Transportasi Cd ke dalam sel melalui Divalent Metal Transporter (DMT1) dengan beberapa bentuk homologi ionik. Selain itu dengan Zn transporter ZTL1 (Zalups & Ahmad, 2002).

2.1.4 Toksisitas Kadmium

Studi yang dilakukan pada pekerja industri menemukan bahwa udara yang terkontaminasi Cd dengan dosis tinggi menyebabkan kerusakan paru bahkan kematian. Sedangkan udara yang terkontaminasi Cd dalam dosis rendah dalam waktu yang lama dapat menyebabkan penyakit ginjal. Sedangkan penelitian pada hewan coba yang diinduksi Cd secara inhalasi ditemukan kerusakan pada paru dan hidung (ATSDR, 2012).

Pekerja industri yang terpapar Cd melalui oral mengalami iritasi pada lambung sehingga menyebabkan diare, muntah bahkan kematian. Paparan Cd pada dosis rendah dalam waktu yang lama menyebabkan kerusakan pada ginjal dan tulang. Penelitian pada hewan coba yang diinduksi Cd ditemukan permasalahan pada ginjal, tulang, anemia, penyakit hati, saraf dan kerusakan

otak. Kanker ditemukan pada pekerja industri yang terpapar Cd secara inhalasi sedangkan hewan coba yang diinduksi Cd mendapatkan hasil yang sama. The U. S. Department of Health and Human Services (DHHS) dan The International Agency for Research on Cancer (IARC) menyatakan bahwa Cd bersifat karsinogenik untuk manusia (ATSDR, 2012).

Kadmium (Cd) menyebabkan stress oksidatif dan kerusakan histopatologi pada membran pada sistem saraf pusat dengan mereduksi asetilkolinesterase, meningkatkan stress oksidatif, menghabiskan glutathione, superoxide dismutase, dan antioksidan lainnya, menghabiskan katalase, glutathione peroksida, glutathione S transferase. Perubahan ini menyebabkan apoptosis pada sel kortikal di saraf pusat (Bernhoft, 2013).

Kadmium (Cd) didalam hati berikatan dengan Metallothionein (MTs), glutathione (GSH) dan protein lainnya. Ikatan MTs dengan Cd memiliki sifat pedang bermata dua, disalah satu sisi sebagai detoks dengan membawa Cd keluar dari intrasel namun disisi lain ikatan ini menyebabkan terjadinya stres oksidatif. Didalam sel Cd ada dalam bentuk terikat dan tidak terikat yang apabila terkumpul dalam mitokondria menyebabkan kerusakan/cell death. Cd mempengaruhi fosforilasi oksidatif mitokondria dan pada dosis tinggi bisa menghambat respirasi basal. Dosis 10 μM Cd menyebabkan proliferasi/apoptosis yang tertunda sedangkan dosis tinggi > 50 μM Cd menyebabkan terjadinya nekrosis (Nair, *et al.*, 2013).

Mitokondria merupakan target dari toksisitas Cd. Cd berikatan dengan protein thiol pada membran mitokondria sehingga mempengaruhi transisi permeabilitas mitokondria, menghambat reaksi rantai respirasi dan menghasilkan ROS. Cd menghambat kompleks III mitokondria menghasilkan akumulasi semiubiquinon pada Q. Semiubiquinon yang tidak stabil adalah prone ke oksigen

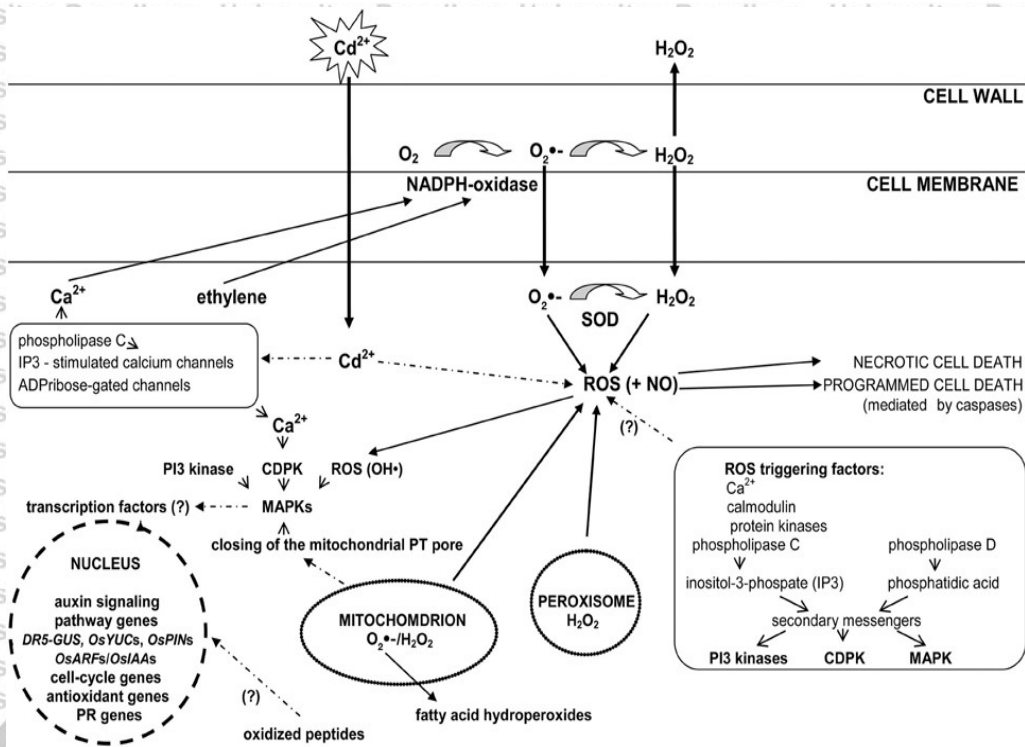
molekular ke bentuk superoxide anion (Dorta, *et al.*,2003; Wang, *et al.*,2004; Balyaeva, *et al.*,2008).

Beberapa studi mengaitkan antara Cd dan ROS, dimana Cd bisa menghasilkan ROS dan ROS ini sebagai penyebab intoksikasi Cd. Berhubung Cd bukan logam fenton sehingga tidak bisa menghasilkan ROS secara langsung.

Namun Cd ini menghasilkan ROS lewat beberapa mekanisme. Pertama Cd membebaskan logam aktif redoks seperti besi dan cooper dari sitoplasma dan protein membran termasuk feritin yng mana menyebabkan peningkatan konsentrasi ion besi yang tak terikat ion besi yang tak terikat ini menyebabkan stress oksidatif melalui reaksi Fenton(Casalino, *et al.*,1997; Waisberg, *et al.*,2003). Kedua Cd ini menghambat rantai transport elektron menghasilkan aliran elektron tidak berpasangan dan ROS. Cd menghambat aktivitas kompleks II dan Kompleks III didalam mitokondria. Ketidakmampuan elektron transfer melalui kompleks III dengan Cd mungkin karena pengikatan Cd dengan semi-ubiquinone dan sitokrom b kompleks III, yang mengakibatkan akumulasi semiubiquinone tidak stabil, sehingga menyebabkan kebocoran elektron untuk molekul oksigen untuk membentuk $O_2^{\bullet -}$ (Wang, *et al.*, 2004).

Ketiga, Cd menurunkan antioksidan intraselular atau endogen. Glutathione (GSH) adalah target utama dari Cd. Ditemukan bahwa toksisitas Cd biasanya terlibat dengan menipisnya GSH seluler dan kelompok sulfhidril protein-terikat, yang mengakibatkan gangguan keseimbangan redoks selular yang mengarah ke peningkatan produksi ROS seperti $O_2^{\bullet -}$, H_2O_2 , dan OH^{\bullet} (Bagchi, *et al.*,1997; Liu & Jan, 2000). Akhirnya, paparan Cd menekan enzim antioksidan seperti superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT) dan glutathione peroxidase (GPx).

Namun, perubahan ini enzim antioksidan bergantung pada durasi dan konsentrasi paparan Cd (Casalino, *et al.*, 1997; Waisberg, *et al.*, 2003; Wang, *et al.*, 2004).



Gambar 2.2 Peran Cd dalam menginduksi ROS

Cd menghasilkan ROS melalui reaksi non enzimatis dan enzimatis (dikatalisis oleh NADPH oksidase, enzim SOD) di berbagai bagian sel seperti membran plasma dan mitokondria. Cd menginduksi produksi ROS dipicu oleh calmodulin, protein kinase, phospholipase C dan phospholipase D. Phospholipase menginisiasi sinyal selanjutnya melalui peningkatan level phosphatidylinositol-triphosphate (IP₃) atau phosphatidic acid. Molekul ini mengaktifkan secondary messengers seperti lipid dan protein kinase termasuk phosphatidylinositol 3 kinase (PI-3-kinase), mitogen activated protein kinase (MAPKs) dan calcium dependent protein kinase (CDPKs). MAPKs ini mempengaruhi faktor transkripsi (Chmielowska, *et al.*, 2014)

2.2 Disfungsi Endotel

2.2.1 Endotel

Organ fungsional Endotelium vaskular terdiri dari sekitar $1-6 \times 10^{13}$ sel endotel dan menyumbang sekitar 1 kg dari total berat badan. Selama bertahun-tahun setelah penemuannya, endothelium diyakini menjadi inert, semi-permeabel menjadi penghalang antara darah yang beredar dengan jaringan sub-endotel.

Namun, penelitian terbaru menjelaskan peran yang lebih kompleks dari endotel yakni sebagai pemeliharaan homeostasis vaskular dengan merilis berbagai faktor

vasoaktif yang melebar dan menyempitkan pembuluh darah tergantung stimulus yang didapatkan (Rubanyi,1993).

Vasodilatasi dimediasi oleh faktor-faktor seperti nitrat oksida (NO), diturunkan endotelium faktor hyperpolarising (EDHF) dan prostacyclins, sementara vasoconstrictory adalah dimediasi oleh faktor-faktor seperti endotelin-1 (ET-1), angiotensin II dan tromboksan A2. Faktor endotel yang diturunkan ini, NO, yang awalnya diidentifikasi sebagai endothelial-derived relaxing factor (EDRF), karena telah menimbulkan banyak minat karena dianggap vasodilator hasil sintesis endogen dalam tubuh, dan penanda kunci fungsi dan disfungsi endotel (Strijdom,2009).

Tabel 1. Faktor-faktor vasoaktif yang dilepaskan oleh sel endotel (Mundau et al,2012)

Endothelium derived factor	Efek fisiologi	Sumber enzim dan mekanisme aksi
Nitric Oxide (NO)	Vasodilator poten Menghambat inflamasi, proliferasi dan migrasi VSMC, agregasi dan migrasi platelet Mengatur kontraktilitas miokard	Disintesis dari enzim eNOS, nNOS dan iNOS, dengan eNOS sumber endotel utama NO selama kondisi fisiologis berdifusi dari sel endotel untuk mendasari VSMC mana ia mengikat larut guanylyl siklase, yang mengarah ke kaskade kejadian yang pada akhirnya mengakibatkan relaksasi pembuluh darah
Prostasiklin (PGI2)	Mengatur metabolisme jantung kardioprotektif selama iskemia-reperfusion injury agen vasodilatasi	Berasal dari asam arakidonat oleh siklooksigenase-2 (COX-2)
Endothelium-derived hyperpolarising factor (EDHF)	Menghambat agregasi platelet Exerts efek vasodilatasi, khususnya di arteri kecil diameter ≤ 300 m	Identitasnya masih dicurigai dengan calon yang diusulkan seperti ion kalium dan hidrogen peroksida Penyebab hubungan VSMC dengan cara hyperpolarisation membran
Endothelin-1 (ET-1)	Vasokonstriktor poten	Sintesis oleh enzim endothelin-converting Exerts dampaknya melalui dua

Thromboxane A (TXA₂)

Vasokonstriktor poten

Angiotensin II

Vasokonstriktor poten

reseptor: ETA diekspresikan pada sel-sel endotel dan ETB pada VSMC. Berasal dari asam arakidonat oleh COX-1

- Sintesis oleh angiotensin converting enzyme

memunculkan efek melalui dua reseptor: AT1 yang mempromosikan vasokonstriksi dan proliferasi sel, dan AT2 yang antagonises efek AT1

2.2.2 Definisi Disfungsi endotel

Disfungsi endotel didefinisikan sebagai kegagalan endotel dalam melakukan fungsi fisiologis yang merupakan respon maladaptif terhadap rangsangan patologis. Disfungsi Endotel umumnya terkait dengan penurunan bioavailabilitas oksida nitrat (NO), yaitu ketidakmampuan endotel untuk memulai vasodilatasi dalam menanggapi rangsangan vasodilator seperti asetilkolin atau tegangan geser. Hal ini merupakan pertanda awal atherogenesis. Deteksi dini disfungsi endotel dapat digunakan sebagai indikator perkembangan aterosklerosis dan Infark Heart Disease (IHD) (Chhabra, 2009).

Disfungsi endotel ditandai dengan hilangnya keseimbangan antara faktor vasodilatai dan vasokonstriksi dimana vasokonstriksi menjadi faktor yang dominan sehingga mengarah pada kondisi patofisiologis yang progresif yang dikenal sebagai aktivasi disfungsi endotel atau cedera endotel yang ditandai dengan perubahan proinflamasi, prooksidasi, prokoagulasi maupn provaskular (Boneti, *et al.*, 2003; Rabelink, *et al.*, 2010).

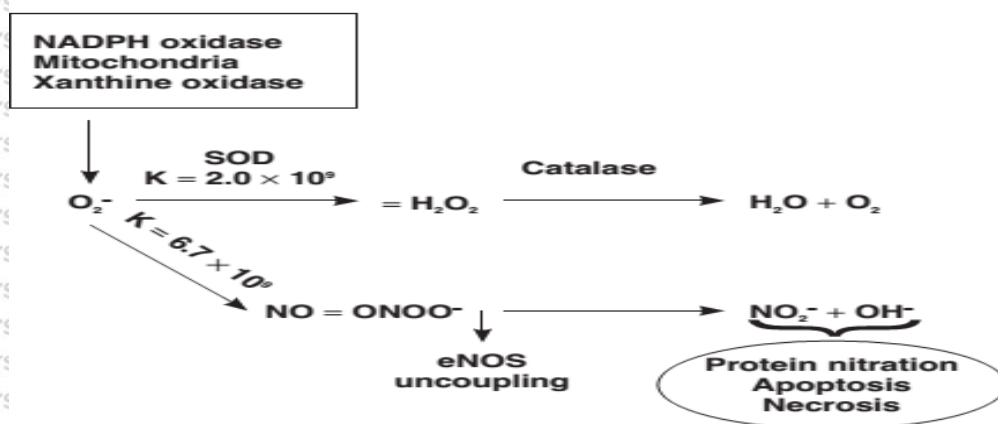
2.2.3 Mekanisme Disfungsi Endotel

Stres oksidatif merupakan dasar dari mekanisme dari Disfungsi Endotel pada mayoritas faktor resiko penyebab atherosclerosis. Menurut literatur, kardiovaskular merupakan faktor risiko yang terkait dengan peningkatan regulasi sumber ROS, terutama NADPH oxidase. Namun, sumber lain dari ROS seperti

xanthine oxidase, cyclooxygenase (COX) dan mitokondria juga memainkan peran penting. Padahal, eNOS berpotensi menjadi pembangkit ROS ketika pada kondisi tak berpasangan. Bahaya efek stres oksidatif termasuk meningkatkan proliferasi VSMC yang mengakibatkan penebalan dinding pembuluh darah, sel endotel mengalami apoptosis, peningkatan ekspresi dan aktivitas dari matriks metalloproteinase yang terlibat dalam pembentukan plaque aterosklerotik (Forstermann & Munzel, 2006; Chhabra, 2009).

Stres oksidatif ditandai peningkatan produksi oksidan dan penurunan tingkat aktivitas antioksidan seperti superoksida dismutase (SOD), Vitamin C dan E. Dibawah kondisi fisiologis, enzim SOD mengatur tingkat O_2 . Namun peningkatan generasi O_2 menguasai mekanisme pertahanan dari SOD, menghasilkan O_2 bebas untuk bereaksi dengan molekul lain, terutama NO, yang memiliki affinity yang lebih besar. (Pennathur & Heinecke, 2007).

Superoksida (O_2^-) terlibat dalam induksi langsung disfungsi endotel dengan menjadi NO scavenger, yang mengarah ke produksi yang sangat reaktif dan spesies berbahaya reaktif nitrogen (RNS), peroxynitrite. Bahkan, reaksi antara O_2 dan NO telah dilaporkan terjadi lebih cepat (kecepatan konstan = $6,7 \times 10^9$ m / s) dibandingkan dismutasi dari O_2 Oleh SOD (laju konstan = $2,0 \times 10^9$ m / s) 0, 49 Tingginya kadar peroxynitrite yang merugikan sel, oksidatif merusak DNA, lipid dan protein. Selain menjadi sitotoksik, kerusakan peroxynitrite struktur eNOS yang rumit, mengarah ke eNOS uncoupling, yang selanjutnya menjadi Disfungsi endotel (Huang, 2003; Kuzkaya, *et al.*, 2003) (Gbr 2.3)



Gambar 2.3. ROS & RNS

Anion superoxide (O_2^-) dihasilkan dari NADPH oksidase, mitokondria & xanthine oxidase dirubah menjadi hydrogen peroxide (H_2O_2) oleh Superoxide Dismutase (SOD) yang mana diurai menjadi air dan oksigen oleh enzim katalase. O_2^- memiliki afinitas yang lebih tinggi pada NO ketika berlebihan sehingga memproduksi peroxynitrit yang menyebabkan berbagai kelainan pathophysiology (Mudau *et al.*, 2012).

Peroxynitrite merupakan kofaktor pengoksidasi dari eNOS, mengubah BH_4 ke bentuk tidak aktif, trihydrobiopterin radikal (BH_3^-), yang pada gilirannya menyebabkan uncoupling eNOS. Selanjutnya, peroxynitrite dapat mengoksidasi cluster seng tiolat di tengah enzim eNOS, yang mengakibatkan hilangnya ion seng dan pembentukan ikatan disulfida antara monomer enzim, dan dengan demikian gangguan situs mengikat untuk BH_4 dan L-arginine (Förstermann & Münzel, 2006).

Kondisi stress oksidatif menyebabkan oksidan seperti peroxynitrite dan hydrogen peroksida menginduksi eNOS uncoupling. Oleh karena itu, selama kondisi stres oksidatif, eNOS menyimpang dari perannya menjadi regulator penting dari fungsi sistem kardiovaskular dengan menghasilkan O_2^- sehingga terbentuk lingkaran setan, dimana pada kondisi stress oksidatif eNOS uncoupling mensintesis O_2^- dengan mengorbankan NO (Katusic, 2001; Zou & Cohen, 2002).

Radang adalah mekanisme dasar disfungsi endotel. Dalam kondisi fisiologis, radang pada endotelium pembuluh darah mengubah ekspresi molekul adhesi melalui pelepasan NO. Radang sebagai awal dari disfungsi endotel yang

merupakan faktor resiko penyakit kardiovaskuler. Tampaknya ada hubungan kausal antara stress oksidatif dan peradangan. Stres oksidatif menyebabkan peradangan pada pembuluh darah dan kondisi inflamasi menyebabkan sel sel melepaskan O₂ (Blake & Ridker,2001).

2.2.4 Perkembangan Disfungsi Endotel menjadi aterosklerosis

Disfungsi endotel digunakan untuk memprediksi perkembangan aterosklerosis dan akhirnya IHD. Perkembangan dari perubahan awal diamati pada endotel vaskular , aterosklerosis bersifat kompleks dan multifaktorial. Sel endotelium sehat yang masih utuh adalah penghalang yang sangat permeable dan tidak mempromosikan adhesi leukosit dan invasi, atau agregasi platelet dan adhesion. (Libby, 2002; Yang & Ming, 2006)

Sebagian endothelium pembuluh darah berada pada kondisi disfungsional sehingga homeostasis menjadi terganggu, yang menyebabkan berkurangnya anti-oksidan, anti-inflamasi dan anti-trombotik yang disebabkan karena berkurangnya bioavailabilitas NO, peningkatan permeabilitas endotel (barrier disfungsi), diregulasi kadar sitokin pro-inflamasi, dan ekspresi molekul adhesi seperti VCAM-1 dan ICAM-1, yang memfasilitasi adhesi leukosit ke endothelium. Adhesi leukosit merupakan salah satu langkah pertama dalam inisiasi aterosklerosis. Setelah memasuki endotelium, leukosit (monosit dan limfosit) menyeberangi endotelium dan bermigrasi ke intima. Untuk intima dimediasi oleh kemo-atraktan seperti monosit kemotaktik protein-1 (MCP-1)

Setelah mencapai intima, monosit berubah menjadi makrofag dan mengekspresikan reseptor yang memfasilitasi penyerapan lipid. Serapan dan akumulasi lipid menyebabkan transformasi makrofag menjadi sel busa, yang memulai lesi aterosklerosis dan lebih meningkatkan pelepasan cytokines. inflamasi Melalui mekanisme yang kompleks, kaskade kejadian, yang dimulai dengan pembentukan awal lesi aterosklerotik, yang menyebabkan lesi canggih

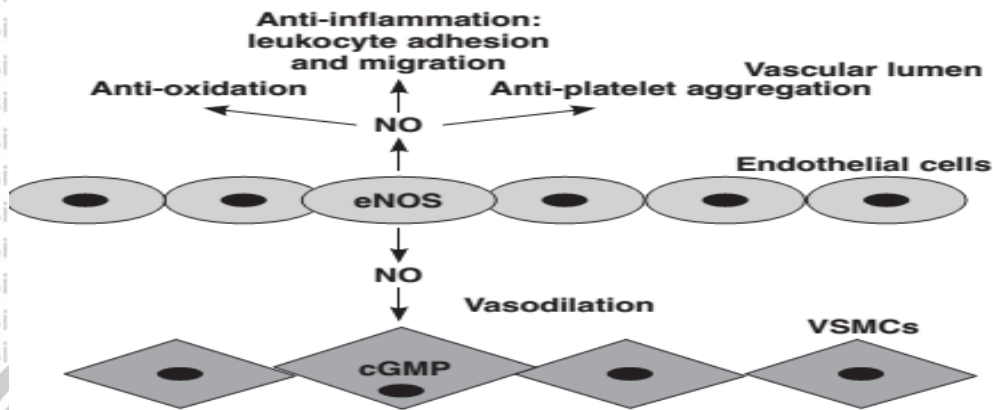
ditandai dengan pembentukan plak (Libby, 2000 ; Osto&Coestino,2000; Ruberg&Loscalzo, 2005).

2.3 Nitrat Oksida

Nitrit Oksida (NO) disintesis didalam tubuh, memiliki peran fisiologi dan patologis di dalam sistem kardiovaskuler, bersifat vasodilator, anti inflamasi dan memiliki efek kardioprotektif (Moncada, *et al.*,2006). Karena bersifat gas dan radikal bebas yang natural NO mampu berdifusi ke dalam sel dan jaringan dan bereaksi dengan berbagai molekul yang ada didalam tubuh. NO disintesis dari asam amino L Arginin yang merupakan keluarga enzim nitrit oksida sintase (NOS). NOS sendiri terdiri dari 3 yakni Neuron NOS, Induksi NOS (iNOS) dan endotel NOS (eNOS) (Alderton, *et al.*,2001;Fostermann & Sessa,2011) eNOS dan nNOS adalah enzim-enzim konstitutif yang tergantung kalsium dan menghasilkan kadar rendah NO. Inducible Nitrit Oxide Sintase (iNOS) adalah kalsium independen, ekspresinya diprovokasi oleh sitokin inflamasi, dan menghasilkan sejumlah besar NO, sekitar 1 000 kali lipat lebih dari eNOS atau nNOS. Hal ini dapat memiliki konsekuensi yang berpotensi berbahaya karena kelebihan NO dapat bereaksi dengan radikal bebas anion superoksida (O_2^-), menghasilkan spesies reaktif yang sangat berbahaya, peroxynitrite. (Strijdom, *et al.*,2009)

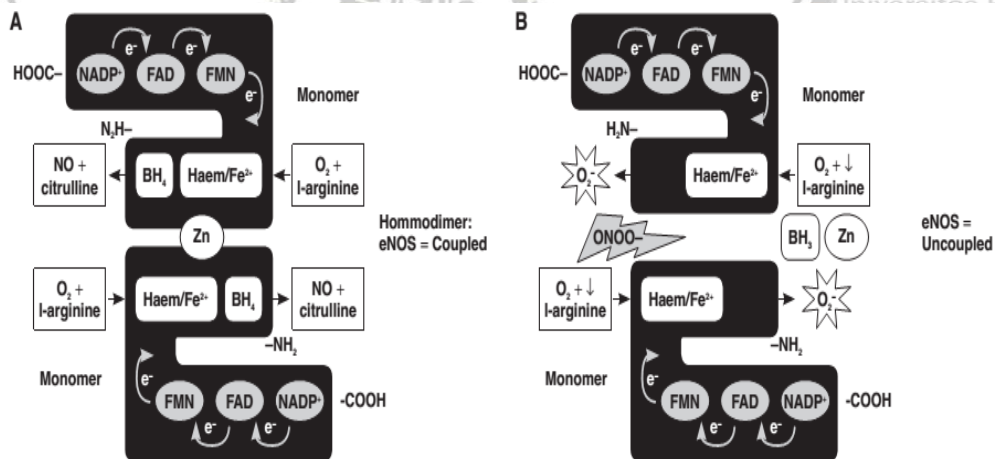
Semua isoform NOS memerlukan kofaktor seperti (6R) -5, 6, 7, 8-tetrahydrobiopterin (BH₄), flavin adenin dinukleotida (FAD), flavin mononukleotida (FMN), dan besi protoporfirin IX(Haem). Dari tiga isoform, diketahui eNOS adalah isoform utama yang bertanggung jawab untuk produksi NO dalam kondisi fisiologis dalam sistem kardiovaskular dan sel endotel pada khususnya, mempengaruhi mekanisme relaksasi pada VSMC. (Alderton, *et al.*,2001; Dudzinski & Michel,2007).

Kegagalan protein eNOS untuk dimerise, atau tidak adanya beberapa kofaktor tersebut akan menyebabkan enzim catalysing membentuk O_2^- bukannya NO, mekanisme ini (Gambar 2.5) sebagai eNOS uncoupling. eNOS uncoupling merupakan mediator penting dari patofisiologi Disfungsi Endotel (Zhao, *et al.*, 2015).



Gambar 2.4. Sintesis NO, mekanisme kerja dan efek fisiologi

NO disintesis oleh eNOS pada sel endotel dan berdifusi pada sel otot polos vaskular (VSMCs). NO mengaktivasi second meseger cyclic guanosine monophosphate yang menyebabkan relaksasi dan vasodilatasi VSMCs. Selain itu NO mengatur homeostasis vskular dengan pengaruh dari antioksidan, anti inflamasi dan anti platelet (Mudau, *et al.*, 2012)



Gambar 2.5. eNos couple dan uncouple

(A) Pada kondisi substrat dan kofaktor yang cukup serta tidak adanya reaktif sprcies yang berbahaya, eNOS monomer akan membentuk enzim dimeric couple dan memproduksi NO fisiologis. (B) Penurunan level substrat, L-arginin dan reaktif spesies yang berbahaya yang disebabkan oleh peningkatan ONOO⁻ menyebabkan kegagalan enzim untuk dimerise menyebabkan uncouple eNOS dan produksi O_2^- disamping NO (Mudau, *et al.*, 2012).

2.4 Stress Oksidatif

Stress oksidatif didefinisikan sebagai hilangnya sistem keseimbangan antara oksidan dan antioksidan didalam tubuh. Hal ini merupakan kondisi yang berbahaya buat tubuh seperti halnya peroksidasi lipid dan kerusakan DNA.

Stress oksidatif merupakan fenomena adaptasi dan regulasi dari signal transduksi (Yoshikawa & Naito,2002).

Atom pada umumnya berpasangan, tapi beberapa dari atom ini memiliki elektron yang tidak berpasangan. Atom yang beredar dan tak memiliki pasangan inilah yang disebut dengan free radikal. Atom yang tidak berpasangan ini bersifat tidak stabil dan sangat reaktif. Sebuah molekul oksigen (O_2) memiliki empat-elektron pengurangan ketika dimetabolisme in vivo. Selama proses ini, metabolit oksigen reaktif dihasilkan oleh eksitasi elektron sekunder untuk penambahan energi atau interaksi dengan unsur-unsur transisi. Metabolisme oksigen reaktif dihasilkan lebih tinggi dari molekul oksigen asli dan disebut spesies oksigen aktif.

Superoksida, hidrogen peroksida, radikal hidroksil, dan singlet oksigen adalah spesies oksigen aktif dalam arti sempit. (Krumova & Cosa,2016)

Penggunaan Oksigen di dalam tubuh menghasilkan berbagai turunan oksigen radikal. Karena tubuh dilengkapi dengan mekanisme yang rumit untuk menghapus spesies oksigen aktif dan radikal bebas, ini oleh-produk metabolisme oksigen tidak selalu merupakan ancaman bagi tubuh dalam kondisi fisiologis.

Namun, jika spesies oksigen aktif atau radikal bebas yang dihasilkan berlebihan atau di kondisi abnormal, keseimbangan antara pembentukan dan penghapusan hilang, mengakibatkan stres oksidatif. Karena itu, spesies oksigen aktif dan molekul radikal bebas dapat melakukan serangan di membran biologis dan jaringan, sehingga mendorong berbagai penyakit. dengan kata lain stres oksidatif didefinisikan sebagai kondisi berbahaya bagi tubuh, yang muncul ketika reaksi

oksidatif melebihi reaksi antioksidan sehingga hilangnya keseimbangan antara mereka (Yoshikawa & Naito, 2002).

2.4.1 Sumber dan Reaksi ROS

ROS dapat diproduksi dari substansi endogen maupun eksogen. Sumber potensial endogen antara lain mitokondria, metabolisme sitokrom 450, peroksisom, aktivasi sel inflamator. Mitokondria menghasilkan hydrogen peroxide (H_2O_2) yang bersifat non radikal. H_2O_2 dapat didekomposisi menjadi hidroksil dan superoksida radikal. Selain sebagai tempat penghasil radikal bebas mitokondria juga berfungsi sebagai penghasil antioksidan yang antaralain GSH dan superoksida dismutase (SOD) dan glutathione peroxidase yang akan meminimalisir efek dari stress oksidatif pada organ ini (Valko, *et al.*, 2006).

Sumber superoksida seluler yang lain adalah Xantin Oksidase yang merupakan sumber radikal bebas seluler. XO ini merupakan anggota molybdenum iron sulfur flavin hydroxylase dan katalase. Pada reaksi hypoxantin menjadi xantin dan xantin menjadi uric acid, pada kedua reaksi oksigen tereduksi dimana menjadi superoksida pada step awal dan menjadi hydrogen peroksida pada step berikutnya (Valko, *et al.*, 2004).

Sumber ROS dari endogen seluler yang lain adalah neutrofil, eosinofil, dan makrofag. Makrofag mampu menyebabkan ROS sumber endogen tambahan reaktif seluler termasuk anion superoksida, nitrat oksida dan hydrogen peroksida (Birben, *et al.* 2012). Sitokrom P450 merupakan sumber ROS melalui induksi enzim cytochrome P450, sehingga menghasilkan anion superoksida dan hydrogen peroksida. Selain itu, mikrosom dan peroksisom merupakan sumber ROS. Mikrosom bertanggung jawab atas 80% H_2O_2 . Peroksisom dikenal untuk menghasilkan H_2O_2 , tapi tidak $O_2^{\bullet-}$, dalam kondisi fisiologis (Gupta, *et al.*, 1997).

ROS juga dapat dihasilkan oleh proses eksogen, antara lain agen lingkungan yang karsinogen yang non genotoksik yang secara langsung maupun tidak langsung menyebabkan terbentuknya ROS. Induksi stres oksidatif dan kerusakan telah diamati berikut paparan berbagai xenobiotik. Ini melibatkan senyawa klorin, logam (redoks dan non-redoks) ion, radiasi dan barbiturat. Sebagai contoh 2-butoxyethanol dikenal untuk menghasilkan ROS secara tidak langsung, yang menyebabkan kanker pada tikus (Klauning, *et al.*, 1997).

Beberapa studi menemukan logam dapat menginduksi toksik dan karsinogen dengan berperan dalam pembentukan ROS (Leonard, *et al.*, 2004; Henkler, *et al.*, 2010). Logam memediasi bentuk free radikal berperan dalam modifikasi DNA, meningkatkan lipid peroksidasi, dan mengubah keseimbangan kalsium dan sulphhydryl (Haouem & Hani, 2013).

2.4.2 Biomarker stres oksidatif

Biomarker menurut National Health Institute didefinisikan alat untuk mengukur dan mengevaluasi sifat objek sebagai indikator proses biologis fisiologis, patologis, respon patologi akibat terapi (Zhang, *et al.*, 2001). Penilaian tingkat stres oksidatif menggunakan biomarker dari sudut pandang klinis. Penanda ditemukan didalam darah, urin, dan cairan biologis lainnya mungkin memberikan informasi nilai diagnostik, tetapi akan ideal jika organ dan jaringan menderita dari stres oksidatif dapat dicitrakan dengan cara mirip dengan CT scan dan MRI. Biomarker stres oksidatif diklasifikasikan berdasar interaksi molekul dan ROS lingkungan yang dimodifikasi, dan respon antioksidan akibat stres redoks.

Contoh molekul yang dapat dimodifikasi antara lain DNA, lipid, protein, karbohidrat. Dari modifikasi ini, beberapa diketahui memiliki efek langsung pada fungsi molekul (misalnya menghambat fungsi enzim), tetapi yang lain hanya mencerminkan tingkat stres oksidatif di lingkungan setempat. Makna fungsional

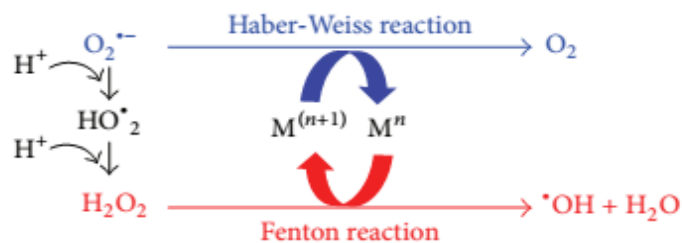
atau peran kausal dari modifikasi oksidatif pada fungsi sel, organ dan sistem diakui sebagai penentu utama validitas penanda (Ho, *et al.*, 2013). Faktor yang mempengaruhi penerapan biomarker ROS antara lain kemudahan memperoleh spesimen biologi yang sesuai, kondisi penyimpanan dan langkah-langkah persiapan spesimen, spesifisitas, sensitivitas dan uji reproduktifitas yang stabil untuk mengukur modifikasi (Donne *et al.*, 2005).

Berbagai penanda telah diusulkan, termasuk peroksida lipid, malondialdehid, dan 4 hidroksinoneril sebagai penanda kerusakan oksidatif pada lipid; isoprostan sebagai produk dari oksidasi radikal bebas asam arakidonat; 8-oxoguanine (8-hydroxyguanine) dan thymineglycol sebagai indikator kerusakan oksidatif pada DNA; dan berbagai produk dari oksidasi protein dan Asam amino termasuk protein karbonil, hydroxyleucine, hydrovaline, dan nitrotirosin. lipid peroksida dinilai dalam klinis sampel bahkan dalam studi yang relatif awal (Yoshikawa & Naito, 2002).

ROS yang paling umum yang dapat mempengaruhi lipid terutama radikal hidroksil ($\text{OH}\cdot$) dan hydroperoxyl ($\text{OH}\cdot_2$). Radikal hidroksil ($\text{OH}\cdot$) berukuran kecil, sangat seluler, larut dalam air, dan spesies kimia yang paling reaktif dari oksigen yang diaktifkan. molekul berumur pendek ini dapat diproduksi dari O_2 dalam metabolisme sel dan di bawah berbagai kondisi stres. Sebuah sel memproduksi sekitar 50 radikal hidroksil setiap detik. Dalam satu hari penuh, setiap sel akan menghasilkan 4 juta radikal hidroksil, yang dapat dinetralkan atau serangan biomolekul (Lane, 2002). Radikal hidroksil menyebabkan kerusakan oksidatif sel-sel karena secara tidak spesifik menyerang biomolekul terletak kurang dari beberapa nanometer dari situsny generasi dan terlibat dalam gangguan seluler seperti neurodegeneration penyakit jantung dan kanker (Halliwell & Gutteridge, 1984; Dizdaroglu & Jarug, 2012).

Secara umum diasumsikan bahwa OH[·] dalam sistem biologis dibentuk melalui lingkaran redoks dengan reaksi Fenton, di mana free ion besi (Fe²⁺) bereaksi dengan hidrogen peroksida (H₂O₂) dan Reaksi Haber-Weiss yang menghasilkan produksi Fe²⁺ ketika superoksida bereaksi dengan besi (Fe³⁺). Sebagai tambahan ke redoks cycle dijelaskan di atas, juga sejumlah lainnya logam transisi termasuk Cu, Ni, Co, dan V dapat bertanggung jawab untuk pembentukan OH[·] dalam sel hidup (Prousek,2007)

Hydroperoxyl radikal (HO₂) memainkan peran penting dalam reaksi kimia peroksidasi lipid. Hydroperoxyl terprotonasi membentuk superoksida menghasilkan H₂O₂ yang dapat bereaksi dengan logam aktif redoks termasuk besi atau tembaga untuk lebih menghasilkan HO[·] melalui reaksi Fenton atau Haber-Weiss. HO₂ merupakan oksidan yang lebih kuat dari anion superoksida radikal dan bisa memulai oksidasi rantai tak jenuh ganda fosfolipid, sehingga mengarah ke penurunan fungsi membran (Bielski, *et al.*,1983).



Gambar 2.6. Reaksi Fenton dan Heber-Weis

Bentuk transisi metal (M^n) yang tereduksi bereaksi dengan hydrogen peroksida (H₂O₂) melalui reaksi fenton mengarah pada pembentukan OH[·]. Superoksida radikal ($O_2^{\cdot -}$) dapat bereaksi dengn bentuk transisi metal $M^{(n+1)}$ yang teroksidasi pada reaksi Haber-Weiss membentuk produksi M^n yang mempunyai pengaruh pada lingkaran redoks(Ayala, *et al.*,2014).

2. 4. 3 Proses Peroksidasi lipid.

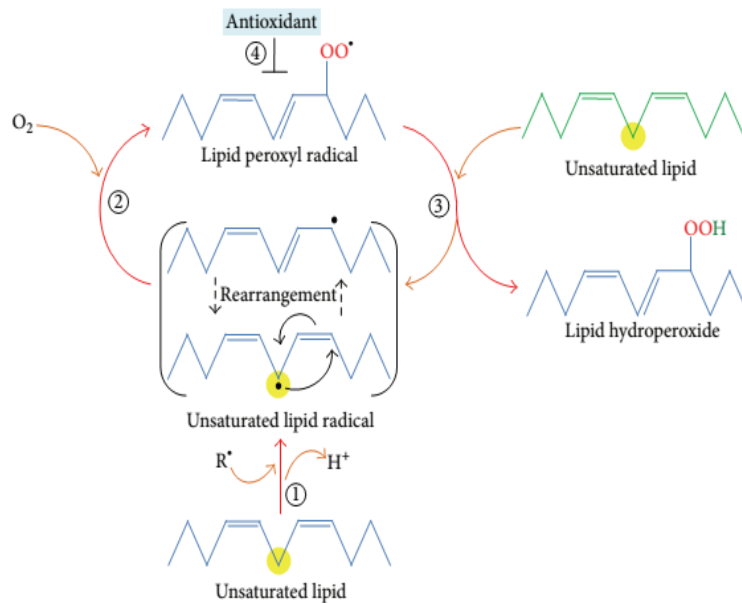
Peroksidasi lipid dapat digambarkan secara umum sebagai suatu proses di mana Oksidan seperti sebagai radikal bebas atau spesies nonradikal menyerang lipid yang mengandung karbon-karbon ikatan rangkap (s), terutama PUFA yang melibatkan hidrogen abstraksi dari karbon, dengan penyisipan

Unive oksigen yang mengakibatkan peroxy lipid radikal dan hidroperoksida seperti Unive yang dijelaskan sebelumnya (Yin, *et al.*, 2011). Glikolipid, fosfolipid (PL), dan Unive kolesterol (Ch) merupakan target merusak dan berpotensi mematikan modifikasi Unive peroxidative. Lipid juga dapat dioksidasi oleh enzim seperti lipoxygenases, Unive cyclooxygenases, dan sitokrom P450 (lihat di atas, lipid sebagai molekul sinyal). Unive Menanggapi membran peroksidasi lipid, dan menurut keadaan metabolik seluler Unive spesifik dan perbaikan kapasitas, sel-sel dapat mempromosikan kelangsungan Unive hidup sel atau menginduksi kematian sel. Dalam kondisi fisiologis atau kadar Unive peroksidasi lipid rendah (kondisi subtoxic), sel-sel mengaktifasi sistem Unive antioksidan mengakibatkan respon stres adaptif. Sebaliknya, kadar peroksidasi Unive lipid yang tinggi (Kondisi beracun) terjadi kerusakan oksidatif, dan sel-sel Unive menginduksi apoptosis atau kedua proses akhirnya menyebabkan kerusakan sel Unive molekul yang dapat memfasilitasi pengembangan berbagai kondisi patologis dan Unive penuaan dini (Volinsky & Kinnunen, 2013).

Proses peroksidasi lipid terdiri dari tiga langkah: inisiasi, propagasi, dan terminasi. Tahap inisiasi peroksidasi lipid, prooxidants seperti hidroksil radikal abstrak alilik hidrogen membentuk lipid karbon-berpusat radikal ($L\cdot$). Pada tahap propagasi, lipid radikal ($L\cdot$) bereaksi dengan oksigen membentuk lipid peroksi radikal ($LOO\cdot$) Yang abstrak hidrogen dari molekul lipid lain menghasilkan L baru dan lipid hidroperoksida ($LOOH$). Dalam Reaksi pemutusan, antioksidan seperti Vitamin E menyumbangkan atom hidrogen pada $LOO\cdot$ dan membentuk Vitamin E radikal yang bereaksi dengan LOO lain \cdot membentuk produk nonradical (Gambar 2.7). (Ayala, *et al.*, 2014).

Produk peroksidasi lipid atau reaksi oksigen dengan lipid tak jenuh menghasilkan berbagai produk oksidasi. Produk utama peroksidasi lipid yang hidroperoksida lipid ($LOOH$). Di antara banyak aldehida yang berbeda yang dapat dibentuk sebagai produk sekunder selama peroksidasi lipid adalah

malondialdehid(MDA), propanal, heksanal, dan 4 hidroksinonerial (4-HNE) (Halder & Bhattacharyya, 2014)

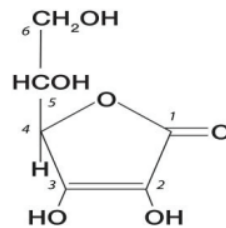


Gambar 2.7. Proses Peroksidasi Lipid

Step 1. Dalam Inisiasi, prooksidants abstrak hidrogen alilik membentuk lipid karbon-berpusat radikal; itu karbon radikal cenderung stabil oleh penataan ulang molekul untuk membentuk diena terkonjugasi. Step 2 tahap propagasi, lipid radikal bereaksi dengan oksigen membentuk lipid peroksi radikal. Step 3 Hidrogen abstrak dari molekul lipid lain menghasilkan lipid radikal baru dan lipid hidroperoksida. Step 4 reaksi terminasi, antioksidan menyumbangkan atom hidrogen pada lipid peroksi radikal spesies menghasilkan pembentukan produk nonradikal (Ayala, et al.,2014).

2.5 Vitamin C

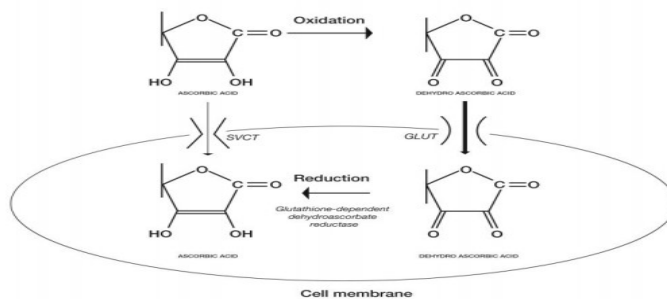
Vitamin C memiliki enam karbon laktone yang disintesis dari glukosa pada hati mamalia, kecuali pada manusia, Non Human Primata, guinea pig. Karena mereka tidak memiliki enzim gulonolactone oksidase yang esensial untuk mensintesis ascorbic acid sebagai Prekursor 2-keto-L-gulonolaktone. (padayatty et al.,2003)



Structure of Vitamin C (Ascorbic Acid)

Gambar 2.8. Struktur Vitamin C (Roomi, et al.,2015)

Vitamin C mudah teroksidasi dan dikonversi ke dehidroaskorbat acid (DHA) pada paparan udara. Dalam studi in vitro Vitamin C (DHA) memasuki sel melalui transport nonspesifik, dengan afinitas rendah, kapasitas tinggi yakni dengan transporter glukosa (gluts – heksosa transporter) dan berkurang secara intraseluler ke L ascorbic acid. L-askorbic acid juga langsung diambil oleh sel-sel melalui transport spesifik, afinitas tinggi, kapasitas rendah dengan transport sodium ascorbate (SVCTs - natrium-askorbat cotransporter). Kedua mekanisme transportasi yang ada disebagian besar sel dalam tubuh (Roomi, et al.,2015).



Gambar 2.9. Penyerapan seluar Vitamin C dan bentuk oksidasinya dehydroascorbic acid (DHA) melalui transporter yang berbeda (Roomi, et al.,2015)

2.5.1 Vitamin C sebagai Antioksidan

Vitamin C disebut sebagai antioksidan karena mendonasikan elektron dan mencegah komponennya teroksidasi. Ketika Vitamin C mendonasikan elektron mereka menjadi kehilangan secara sequential. Bentuk setelah kehilangan satu elektron menjadi free radikal, semidehydroascorbic acid atau

disebut ascorby radikal. Dibandingkan free radikal yang lainya ascorby radikal sifatnya lebih stabil dan tidak reaktif, karena sifat inilah yang menyebabkan free radikal dapat beriteraksi dengan askorbat. Reaktif free radikal ini direduksi dan berinteraksi dengan askorbat, reduksi dari radikal menjadi bentuk yang kurang reaktif disebut dengan free radikal scavending sehingga asam askorbat ini disebut dengan free radikal scavenger (Nimse & Pal, 2015).

Vitamin C ini bisa teroksidasi oleh berbagai spesies yang dibagi menjadi beberapa kelas yang pertama dengan elektron yang tidak berpasangan (radikal) seperti superoxide, hydroxyl radical, peroxy radical, sulphur radical dan RNS. Kelas yang kedua adalah yang reaktif tapi yang tidak radikal termasuk hypochlorous acid, nitroamines. Dan yang ketiga adalah komposisi yang terbentuk dari kelas satu maupun kelas dua atau campuran keduanya yang kemudian bereaksi dengan Vitamin C (Padayatty, *et al.*,2003).

2.5.2 Vitamin C dan Disfungsi Endotel

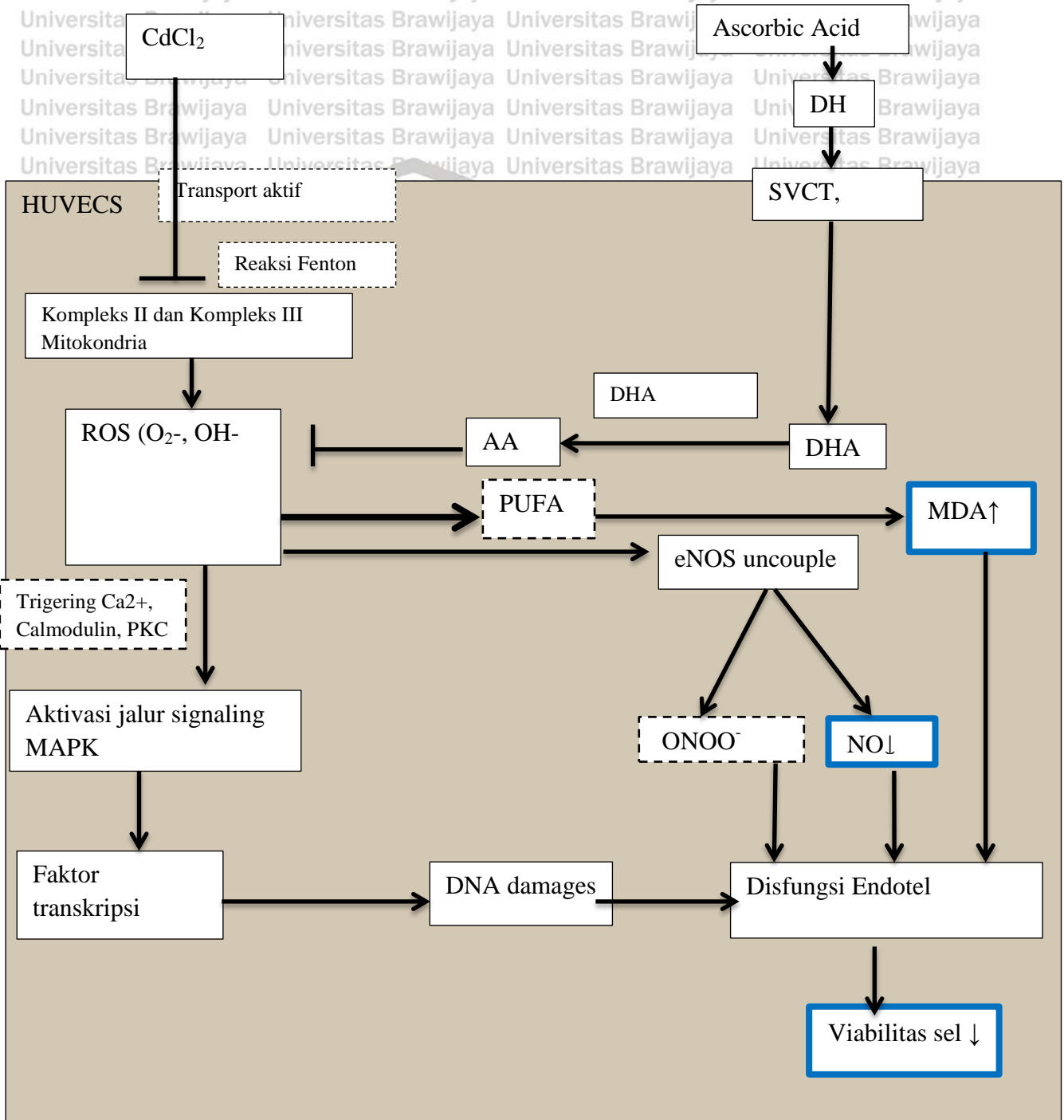
Vitamin C dapat digunakan sebagai terapi disfungsi endotel. Dimana Vitamin C ini berfungsi sebagai penghilang superoksida intraseluler yang menyebabkan NO menjadi tidak aktif dengan diubah menjadi peroxynitrit. eNOS dapat menghasilkan superoksida oleh enzim oxygenase saat eNOS menjadi uncouple yang disebabkan oleh tiak adanya substrat arginin, N-hydroxyarginin dan kofaktor redoks tetrahydrobiopterin (BH4). Pengaruh Vitamin C pada bioavailabilitas NO berkaitan dengan kemampuan mencegah eNOS memproduksi superoksida.. Mekanisme interaksi Vitamin C dengan kompleks enzim atau kofaktor tidak sepenuhnya diketahui. Vitamin C mencegah BH4 teroksidasi oleh ROS dengan menjadi ROS scavenger (Traber & Stevens,2011).



BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan :



: Meningkatkan



: Yang diteliti



: Menghambat



: Yang mempengaruhi



: Mempengaruhi

Kadmium merupakan logam berat yang bersifat toksik yang banyak digunakan dalam kehidupan sehari-hari. Kadmium ekstraseluler memasuki sitosol dengan bantuan divalen metal transporter 1 (DMT-1 (Messner,2015).

Kadmium menyebabkan free radikal dengan menginduksi stress oksidatif melalui empat mekanisme yaitu Pertama, Cd membebaskan logam redoks-aktif seperti besi dan tembaga dari tempat penyimpanannya sehingga menggantikan Fe dan Cu di sitoplasma dan protein membran, pada akhirnya menyebabkan stres oksidatif melalui reaksi Fenton. Kedua, Cd menghambat aktivitas kompleks II dan kompleks III di mitokondria menyebabkan terhambatnya rantai transpor elektron yang menghasilkan aliran elektron uncoupled dan pembentukan ROS ($O_2 \bullet^-$). Ketiga, Cd menurunkan antioksidan scavenger Glutathione (GSH)

dan kelompok sulfhidril *protein-bond*, sehingga terjadi gangguan keseimbangan redoks selular yang mengarah ke peningkatan produksi ROS seperti $O_2 \bullet^-$, H_2O_2 , dan OH. Akhirnya, paparan Cd menurunkan enzim antioksidan seperti superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT) dan glutathione peroxidase (GPx).

ROS yang terbentuk akibat induksi Cd akan mempengaruhi Viabilitas sel, NO, dan MDA. Viabilitas sel mengalami penurunan akibat dari disfungsi endotel.

ROS menyebabkan gangguan signal intraseluler dan regulasi ekspresi gen dan jalur signal transduksi memicu aktivasi MAPKs yang mengubah faktor transkripsi

penyebab kerusakan DNA sehingga terjadi apoptosis yang menyebabkan viabilitas sel endotel menurun, penanda dari disfungsi endotel. NO, disintesis oleh endotel NO synthase (eNOS), merupakan salah satu agen vasodilatasi yang paling penting, adanya ROS (O_2^-) mempengaruhi produksi NO karena terbentuknya OONO menyebabkan penurunan NO. MDA merupakan salah satu marker stress oksidatif. MDA merupakan hasil sekunder dari peroksidasi lipid, hasil reaksi PUFA dengan ROS (OH).

Vitamin C merupakan antioksidan hidrofilik dan ditemukan hampir pada seluruh cairan tubuh. Absorpsi, reabsorpsi dan selular uptake Vitamin C dimediasi oleh sodium dependen Vitamin C transporter (SVCT) ataupun GLUT1 dimana saat memasuki plasma membran berubah menjadi DHA (Dihydro Ascorbic acid) dengan mekanisme NADH dependen dan independen mengalami reduksi menjadi Ascorbic Acid. Vitamin C menghambat ROS dengan menjadi free radikal scavenger.

3.2 Hipotesis Penelitian

Vitamin C (ascorbic Acid) meningkatkan Viabilitas Sel, kadar NO dan menurunkan MDA pada HUVECs yang dipapar $CdCl_2$

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni (*true experimental*) laboratorik dengan menggunakan model *in vitro* menggunakan kultur sel endotel vena umbilikus manusia (HUVECs). Perlakuan diberikan setelah terbentuk sel endotel monolayer pada well. Kultur dipapar dengan kadmium dengan konsentrasi 24,154 $\mu\text{g/l}$ μM dan diterapi Vitamin C dengan konsentrasi 50 μM , 100 μM , dan 200 μM dengan waktu 48 jam.

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk melakukan kultur dan pengukuran variabel.

4.3 Populasi dan Sampel Penelitian

4.3.1 Populasi Penelitian

Populasi target dari penelitian ini adalah dari kultur sel endotel manusia yang didapatkan dari vena umbilikal bayi baru lahir yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

4.3.2 Kriteria Sampel Penelitian

Sampel dari penelitian ini adalah sel endotel dari bayi baru lahir. Seluruh sampel penelitian yang akan diambil vena umbilikalnya telah mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan diminta untuk menandatangani lembar persetujuan (*informed consent*). Berikut ini merupakan kriteria subyek penelitian yang akan diambil vena umbilikalnya

- 1) Kriteria inklusi
 - a) Ibu sehat dengan kriteria HB > 11

b) Persalinan pervaginam / sectio dan bayi sehat dengan kriteria (BB > 2,5 kg, Apgar score 7 – 9

2) Kriteria Eksklusi

a) Ibu menderita hipertensi, diabetes, jantung koroner, preeklamsia dan hiperlipidemia

4.3.3 Pengambilan Sampel

Pemilihan sampel dilakukan secara random dengan memilih ibu yang sesuai kriteria inklusi dan eksklusi lalu minta izin dengan memberi informed consent pada ibu dan keluarganya. Segera setelah kelahiran, umbilikus dipotong sepanjang ± 20 – 30 cm dan langsung dimasukan larutan *cord solution*.

Pengerjaan kultur sel endotel dari vena umbilikus tidak melebihi 12 jam setelah waktu kelahiran. Dilakukan pengambilan sel endotel dari vena umbilikus dengan metode standar yaitu tehnik kolagenase, dan selanjutnya dikultur. Kemudian kultur HUVECs dibagi menjadi 5 kelompok sebagai berikut :

Tabel 4.1 Pembagian Kelompok Kultur

No.	Jenis Kelompok	Keterangan
1.	Kontrol negatif	Tidak diberi kadmium dan Vitamin c
2.	Kontrol positif	Diberi kadmium
3.	Perlakuan 1	Diberi kadmium dengan konsentrasi 24,154 µg/l + Vitamin C 50 µM
4.	Perlakuan 2	Diberi kadmium dengan konsentrasi 24,154 µg/l + Vitamin C 100 µM
5.	Perlakuann 3	Diberi kadmium dengan konsentrasi 24,154 µg/l +Vitamin C200 µM

Sebelum pengambilan sampel terlebih dahulu menyiapkan cord solution tube yang disimpan pada referigerator suhu 4 °C. Metode pembuatan medium cord solution adalah diawali dengan pembuatan medium cord solution dengan 10 ml HBSS yang dilarutkan pada 90 ml *deionized water* lalu dimasukkan 3,75 ml bikarbonat phenol red dan ditambahkan 2,5 ml larutan HEPES terakhir

ditambahkan 1,25 ml gentamycin selanjutnya PH diukur hingga mendapatkan PH 7,4 (warna menyerupai HBSS pekat). Selanjutnya medium cord Solution difiltrasi menggunakan filter 0,2 μ m lalu disimpan dalam suhu 4⁰ C dalam refrigerator selama 1 minggu.

Besar Sampel Penelitian

Besar sampel dalam penelitian ini diperoleh berdasarkan rumus Hanafiyah 2005 sebagai berikut:

$$\text{Federer} : \{(p \times R - 1) (n - 1)\} \geq 15$$

Keterangan :

P = Jumlah perlakuan dan kelompok kontrol

n = Jumlah pengulangan untuk setiap sampel

R = Replikasi

Berdasarkan perhitungan rumus di atas maka besar sampel yang diambil dalam penelitian ini dapat dihitung sebagai berikut:

Perlakuan pada penelitian ini adalah 5 maka pengulangan dapat dihitung yaitu

$$\{(p - 1) (n - 1)\} \geq 15$$

$$(5 - 1) (n - 1) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$n \geq 4,7$, jadi pengulangan tiap perlakuan sampel adalah minimal 5 kali

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian Vitamin C dosis 50 μ M, 100 μ M, dan 200 μ M paparan kadmium CdCl₂ konsentrasi 24,154 μ g/l

4.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini antara lain adalah sebagai berikut:

1. Kadar NO pada medium kultur

2. Kadar MDA pada sel
3. Viabilitas sel

4.5 Batasan Operasional

Tabel 4. 2 Batasan dan Definisi Operasional Penelitian

No.	Definisi Operasional
1. Kultur HUVEc	Kultur Huvecs berasal dari vena umbilikus neonatus dengan SC yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi yang dikultur di laboratorium dalam well plate dan diinkubasi. Karakter sel endothel yang digunakan adalah monolayer, pipih, tingkat kerapatan 70% (confluence), bagian tengah sel berbentuk bulat dan terang, melekat pada dasar media kultur dengan media jernih berwarna merah bata. Diambil dari serbuk
2. <i>Kadmium</i>	kadmium CdCl ₂ (Sigma 28811-1ML-F)
3. Nitrit Oxide (NO)	Enzim yang dihasilkan oleh sel endotel yang berfungsi untuk merespon perubahan yang terjadi dalam sel endotel diukur dengan kalorimetrik metode griess reagen
4. MDA	Merupakan hasil sekunder radikal bebas yang diukur pada sel huvec menggunakan metode TBARS diukur dengan kalorimetrik.
5. Viabilitas sel	Viabilitas sel adalah kemungkinan sel untuk dapat hidup. Viabilitas sel merupakan perbandingan jumlah sel yang hidup dan total sel yang ada. Viabilitas sel dinyatakan dalam%. Viabilitas sel diukur dengan MTT (3-(4, 5- dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) assay. Prinsip dari metode MTT adalah terjadinya reduksi garam kuning tetrazolium MTT (3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid) oleh sistem reduktase. Suksinat tetrazolium yang termasuk dalam rantai respirasi dalam mitokondria sel-sel yang hidup membentuk kristal formazan berwarna ungu dan tidak larut air. Penambahan reagen stopper (bersifat detergenik) akan melarutkan kristal berwarna ini yang kemudian diukur absorbansinya menggunakan plate reader. Intensitas warna ungu yang terbentuk proporsional dengan jumlah sel hidup. Sehingga jika intensitas warna ungu semakin besar, maka berarti jumlah sel hidup semakin banyak.

4.6 Bahan dan Alat Penelitian

4.6.1 Sampel, Alat dan Bahan Kultur HUVECs

Bahan yang digunakan untuk isolasi HUVECs (Crampton, *et al.*, 2007; Baudin, *et al.*, 2007) adalah:

a. Media Pengambilan Umbilikus:

1. Hank's Balance Salt Solution (HBSS) dari SIGMA (H 1641)
2. Gentamycine (Gentamerck)
3. Sodium Hydrogen Bicarbonate (SHB) dari SIGMA
4. Phenol Red dari SIGMA (P 5530)
5. HEPES solution dari SIGMA
6. Deionized water (WFI Otsuka)

b. Bahan Isolasi sel Endotel

Collagenase type II (SIGMA, C 6885), Serum Free, Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (SIGMA, D 1408), Deionized water (WFI Otsuka).

Bahan untuk pembuatan Serum Free:

1. Medium 199 with Hank's Salt, with L-glutamine, without Sodium Bicarbonate (GibcoBRL)
2. Penicilline (~100 μ /ml) SIGMA
3. Streptomycine (~100 μ /ml) SIGMA
4. Larutan Natrium Bicarbonate (21 mM/ml)
5. L-Glutamine (2 mM/ml) dari SIGMA (G 7513)

c. Bahan Media Kultur

1. Serum Free
2. Newborn Calf Serum (NCS) dari SIGMA (N 4637)

4.6.2 Instrumen Kultur HUVECs

LAF (*laminary air flow*) dari ESCO, Incubator CO₂ (Heraus), Neraca Analitik, lampu ultra violet, Sentrifuge, mikroskop inverted dengan monitor, mikro pipet, spuit 20 cc, filter 0,2 µm dan filter holder, spuit 10 cc, *canulle*, flask 25 cm², bola hisap, pipet volume.

4.7 Prosedur Kerja

Pendekatan yang dilakukan untuk membuktikan hipotesis adalah dengan melakukan penelitian eksperimental pada HUVECs. Dasar menggunakan endotel karena proses penting pembentukan pembuluh darah di perankan oleh sel endotel.

4.7.1 Pembuatan Larutan HEPES

HEPES 4,76 gram dilarutkan dalam 20 ml deionized water, kemudian disterilisasi dengan filter 0,2 µm dan disimpan pada suhu -20°C.

4.7.2 Pembuatan Larutan Bicarbonate-Phenol Red

Sodium hydrogen bicarbonate 4,4 gram dan phenol red 3 mg dilarutkan dalam 100 ml deionized water dengan pH 7,6, kemudian disterilisasi dengan filter 0,2 µm dan disimpan pada suhu -20°C.

4.7.3 Pembuatan Medium *Cord Solution*

HBSS 10 ml dan tambahkan deionized water 90 ml, ditambahkan bicarbonate phenol red 3,75 ml, larutan HEPES 2,5 ml, Gentamycine 1,25 ml dan diukur pH pada 7,4 (warna menyerupai HBSS pekat). Sterilisasi dengan filter 0,2 µm dan disimpan dengan refrigerator suhu 4°C.

4.7.4 Pembuatan Larutan Penicilline-Streptomycine (pen-step)

Penicilline 23,95 mg dan Streptomycine 52,5 mg dilarutkan dalam 10 ml deionized water, kemudian disterilisasi dengan filter 0,2 µm dan disimpan pada suhu -20°C.

4.7.5 Pembuatan Larutan Glutamine

L-glutamine 0,292 g dilarutkan ke dalam 10 ml deionized water kemudian disterilisasi dengan filter 0,2 μm dan disimpan pada suhu -20°C .

4.7.6 Pembuatan Medium Serum Free

Pen-step 1,25 ml dimasukkan ke dalam 100 ml M 199 dan ditambahkan 5 ml natrium bicarbonate serta 1,25 ml glutamine, kemudian disterilisasi dengan filter 0,2 μm dan disimpan dalam refrigerator suhu 4°C dalam keadaan tertutup aluminium foil.

4.7.7 Pembuatan Medium Kultur

Serum freedengan pH 7,2 sejumlah 20 ml disiapkan dalam kondisi tertutup aluminium foil, kemudian ditambahkan 2,5 ml NCS, diukur pH 7,1, disterilisasi dengan filter 0,2 μm dan disimpan dalam refrigerator suhu 4°C dalam keadaan tertutup kertas aluminium foil (digunakan selama 1 minggu).

4.7.8 Pembuatan Larutan *Collagenase*

Larutan *collagenase* dibuat dengan konsentrasi 0,5 mg/cc, kemudian di sterilisasi dengan filter 0,2 μm .

4.7.9 Pembuatan Larutan Buffer HEPES 100 cc

1. NaCl	0,8442 g
2. KCl	0,0373 g
3. MgCl_2	0,0203 g
4. CaCl_2	0,0368 g
5. HEPES	0,3904 g

4.7.10 Pengambilan Umbilikus

Umbilikus diperoleh dari balai kesehatan ibu dan anak dengan persalinan SC. Pengerjaan kultur sel endotel dilakukan tidak melebihi 12 jam setelah waktu kelahiran. Botol berisi *cord solution* yang dipergunakan untuk mengambil umbilikus dipersiapkan di refrigerator (suhu 4°C). Segera setelah kelahiran,

umbilikus dipotong sepanjang ± 20 cm dan langsung dimasukkan dalam larutan *cord solution*.

4.7.11 Isolasi dan Pembuatan Kultur Sel Endotel (HUVECs)

Umbilikus dibersihkan dari jaringan dan clot menggunakan kertas tissue yang disemprot alkohol 70%. Masing-masing ujung umbilikus dipotong transfersal sehingga terlihat 2 arteri dan 1 vena. Vena terlihat ber dinding tebal, besar dan elastis. Cannule dimasukkan pada salah satu ujung vena (± 1 cm), kemudian diikat erat dengan benang. Vena dibilas dengan 10 ml larutan PBSA melalui cannule yang telah terpasang dengan spuit 20 cc. Setelah bersih, ujung umbilikus dilakukan pengkleman.

Larutan *collagenase* dimasukkan seperti cara di pembilasan vena dan spuit dibiarkan menancap pada cannule. Selanjutnya umbilikus dihangatkan dengan cara didekap dengan kedua belah tangan dan didekatkan dengan bunsen (agar mencapai suhu $\sim 37^{\circ}\text{C}$) selama 7 menit. *Collagenase* (yang mengandung endotel) dikeluarkan dari umbilikus dengan cara disedot melalui spuit yang masih terpasang pada ujung cannule. Kemudian *collagenase* tersebut dimasukkan pada tabung sentrifuge steril 15 cc. Umbilikus dibilas dengan 8 cc larutan PBSA seperti pembilasan vena untuk membas sel endotel yang masih tersisa. Kemudian larutan disedot kembali seperti pada penyedotan umbilikus melalui spuit dan tambahkan ke dalam tabung sentrifuge yang berisi larutan *collagenase*.

Larutan yang berisi sel endotel tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 8 menit. Supernatan dibuang, kemudian ditambahkan 4 ml medium kultur pada pellet dan resuspensi dengan cara pipetting sehingga sel sel endotel terpisah.

Larutan dipindahkan ke dalam plate 24 yang sebelumnya telah dilapisi dengan larutan gelatin 0,2%, kemudian dimasukkan pada inkubator CO_2 5%

pada suhu 37°C selama 20 menit. Plate diambil dan sel edotel diamati dengan mikroskop inverted pembesaran 400x. Jika sel sudah menempel pada dasar flask, medium kultur diambil dan sel dibilas dengan larutan serum free 3 ml melalui filter 0,2 µm. Serum free diambil dengan spuit steril dan digantikan dengan medium kultur 4 ml melalui filter 0,2 µm. Plate 24 dimasukkan ke dalam inkubator sampai monolayer (membentuk cobblestone) kurang lebih 3-4 hari dan medium diganti setiap 2 hari sekali.

4.7.12 Induksi CdCl₂ pada Kultur HUVECs

Medium kultur HUVECs yang telah *confluent* diganti yang baru, kemudian diberikan CdCl₂ dengan konsentrasi 24,154 µg/l yang merupakan LD 50 dari penelitian pendahuluan menggunakan tiga jenis konsentrasi 0,153 µg/l, 1,53 µg/l, dan 15,3 µg/l. berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh lee, *et al.*,

4.7.13 Pemberian Vitamin C

Pada kelompok perlakuan diberikan terapi menggunakan Vitamin C berbagai konsentrasi (50µM, 100 µM , 200 µM) bersamaan dengan CdCl₂ dengan cara menggunakan tetesan yang telah dihomogenisasi ke dalam kultur sel endothel (HUVECs) , dan di inkubasi hingga 48 jam.

4.7.14 Pengukuran Aktivitas Nitrit Oxide

Metode Pengukuran Kadar Nitrit Oksida (NO) pada penelitian ini menggunakan kit dari cayman katalog No 780001 dimana kit ini mampu mengukur NO total melalui dua tahap dengan tahap awal mengkonversi nitrat menjadi nitrit menggunakan nitrat reduktase tahap selanjutnya dengan penambahan Griess reagen yang akan mengkonversi nitrit menjadi warna ungu tua. Total Nitric Oxide and Nitrate/nitrit assay dengan prosedur pemeriksaan sebagai berikut :

1. 200 µl air atau bufer asay ditambahkan ke sumuran kosong tanpa penambahan reagen.

2. selanjutnya ditambahkan 80 μ l sampel atau sampel diencerkan ke dalam sumuran sesuai pola hingga mencapai volume akhir 80 μ l menggunakan cairan bufer asai.
3. masing-masing sumuran baik sumuran standar dan sumuran yang tidak diketahui (sebagai sampel) ditambahkan 10 μ l campuran kofaktor enzim.
4. Ditambahkan campuran reduktase nitrat untuk semua sumuran.
5. Plate ditutup dan diinkubasi pada suhu ruangan selama satu jam.
6. Setelah memenuhi waktu inkubasi, 50 μ l Griess Reagent R1 untuk tiap sumuran.
7. Segera ditambahkan 50 μ l Griess Reagent R2 untuk setiap sumuran hingga terbentuk warna, kurang lebih selama sepuluh menit pada suhu ruangan tanpa perlu menutup plate.
8. Absorbansi dibaca pada 540 nm atau 550 nm menggunakan plate reader.

4.7.15 Pemeriksaan MDA

Pada pemeriksaan MDA ini menggunakan metode TBAR dari BioAssay System dengan katalog DTBA-100. *Thiobarbituric acid reactive substances* (TBARS) adalah *low molecular weight end products* terutama Malondialdehyde (MDA) yang terbentuk selama dekomposisi produk peroksidasi lemak sehingga terjadi peningkatan level TBAR. Sistem bioasai TBAR asai berdasar pada reaksi reaksi TBARS dengan asam tiobarbiturat membentuk produk berwarna merah muda dengan intensitas warna pada panjang gelombang 535 nm atau 560 nm atau 585 nm.

4.7.15.1 PERSIAPAN SAMPEL

Sampel disimpan tetap beku pada -80 derajat celsius (stabil untuk sebulan). Sampel dideproteinasi terlebih dahulu sebelum diperiksa:

1. Lisat jaringan 100 µl dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi 1.5 ml. Untuk sel, panen 5×10^6 sel dalam 200 µl PBS dingin. Dan untuk menghancurkan sel dilakukan sonifikasi.

Dan jika diinginkan pindahkan 20 µl aliquot untuk analisis protein.

Pindahkan 100 µl sel lysate kedalam 1,5 mL mikro sentrifuse tube yang telah dilabel

2. Ditambahkan 200 µl es 10 % TCA ke dalam 100 µl masing masing sampel. Dan inkubasi di dalam kondisi dingin es selama 5 menit
3. Sampel disentrifugasi 5 menit pada 14.000 rpm pada sentrifugasi Eppendorf. 200 µl supernatan jernih dipindahkan ke tabung berlabel baru. Faktor dilusi untuk sampel sebelum ditreatment $n=3$.

4.7.15.2 Prosedur pemeriksaan kolorimetrik

Water bath atau heat block diatur dalam temperatur 100 derajat celsius. semua komponen *diequilibrasi* ke temperatur ruangan.

Standar kurva. Pertama, sentrifugasi singkat tabung standar ke pellet beberapa MDA yang bisa tersumbat di penutup atau di sisi tabung. Lalu campurkan 4 µl dari 6 M MDA dengan 2396 µl dH₂O (akhir 10 mM MDA). Lalu 30 µM MDA dicampur 3 µl 10 mM MDA dengan 997 µl dH₂O. Selanjutnya standar diencerkan sesuai dengan tabel.

no	30 µM MDA + H ₂ O	Vol (µl)	MDA (µM)
1	300 µl + 0 µl	300	30.0
2	180 µl + 120 µl	300	18.0
3	90 µl + 210 µl	300	9.0
4	0 µl + 300 µl	300	0.0

200 µl tiap standar ditransfer ke tabung berulir 1,5 ml berlabel yang terpisah. 200 µl tiap sampel ditransfer ke tabung terpisah.

1. Reaksi warna. Pada setiap standar dan sampel ditambahkan 200 µl reagen TBA. Tabung vortex dicampur dan diinkubasi pada 100 derajat selsius selama 60 menit. Dinginkan tabung pada suhu ruangan. Vortex dan sentrifugasi tabung secara singkat.
2. Cairan 100 µl dari tiap tabung dipindahkan ke 96 sumuran *flat bottom* . dibaca pada 525 hingga 545 nm.

KALKULASI

Pengurangan OD kosong atau nilai intensitas fluoresen dari semua standar dan nilai sampel. Plot ΔOD_{535nm} atau ΔF dibanding konsentrasi standar dan tentukan puncak bawah kurva standar. Kalkulas konsentrasi TBARS sampel.

$$TBARS = \frac{R_{\text{sampel}} - R_{\text{blanko}}}{\text{slope}(\mu M)^{-1}} \times n \text{ (}\mu M \text{ MDA ekuivalen)}$$

R_{sampel} dan R_{blanko} adalah OD_{535nm} atau nilai intensitas fluoresens sampel dan blanko H₂O (standar 4) . n adalah faktor dilusi sampel ($n=3$ untuk sampel deproteinasi).

4.7.16 Pemeriksaan Viabilitas Sel

Pemeriksaan viabilitas sel menggunakan kita dari Bioassay System. MTT assay merupakan metode yang digunakan untuk mengukur viabilitas sel. Garam kuning 3-[4,5-di-methylthiazol-2yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) akan direduksi oleh sel sel yang masih hidup yang menghasilkan enzim dehidrogenase pada saat mengubah NADH menjadi NADPH. Hasil reduksi ini akan menyebabkan pembentukan formazan pada intraseluler yang berwarna ungu dan dapat diukur dengan penggunaan spektrofotometer dengan panjang gelombang 570 nm (550-600 nm)

Cara Kerja :

1. sel 1×10^6 per mL dibuat suspensi
2. Sel 1×10^6 didilusi menjadi 1×10^4 sel per mL agar dapat ditaruh pada plate dengan konsentrasi 10^3 - 10^5 sel setiap well dalam plate 96
3. Sel yang telah terdilusi diambil 100 μ L dan didistribusikan pada setiap well.
4. Ditunggu sampai konfluen 70-80 %.
5. Medium dalam well diganti setelah konfluen 70-80%
6. Vitamin C dengan konsentrasi 50,100 dan 200 μ M yang sudah dicampur CdCl₂ 24,154 μ g/L didistribusikan pada masing masing well.
7. Sel diinkubasi selama 48 jam.
8. Reagent MTT sebanyak 15 μ L ditambahkan ke setiap well.
9. Sel HUVECs di dalam setiap well diinkubasi kembali selama 2 sampai 4 jam sampai warna ungu terlihat.
10. Reagen detergent ditambahkan ketika presipitat ungu terlihat pada mikroskop.
11. Plate 96 yang berisi sel ditutup dan diletakkan pada tempat yang gelap selama 2 sampai 4 jam atau semalaman pada suhu ruang.
12. Tutup plate dilepaskan dan absorbansi setiap well diukur pada panjang gelombang 570 nm.
13. Grafik absorbansi dibuat dan terakhir dihitung rata rata absorbansinya.

4.8 Rancangan Analisis Data

Data pada penelitian ini dianalisa secara statistik menggunakan software SPSS 23. Untuk melihat data terdistribusi normal dilakukan uji normalitas dengan uji kosmogorof smirnof pada data setiap kelompok yang dilanjutkan dengan uji homogenitas dengan menggunakan uji levene terhadap data setiap kelompok. Sedangkan untuk uji beda diantara lima kelompok dilakukan uji statistik

parametrik one way ANOVA untuk yang memenuhi uji normalitas dan homogenitas. Apabila didapatkan hasil yang signifikan dilanjutkan dengan uji Tukey (Tukey's test) untuk mengetahui perbedaan antar kelompok yang signifikan. Sedangkan Uji beda untuk yang tidak memenuhi uji normalitas dan homogenitas, uji bedanya menggunakan uji statistik non parametrik Kruskal Wallis yang dilanjutkan dengan Mann Whitney untuk melihat perbedaan antar kelompok. Kemaknaan data ditentukan dengan $p \leq 0.05$.



BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

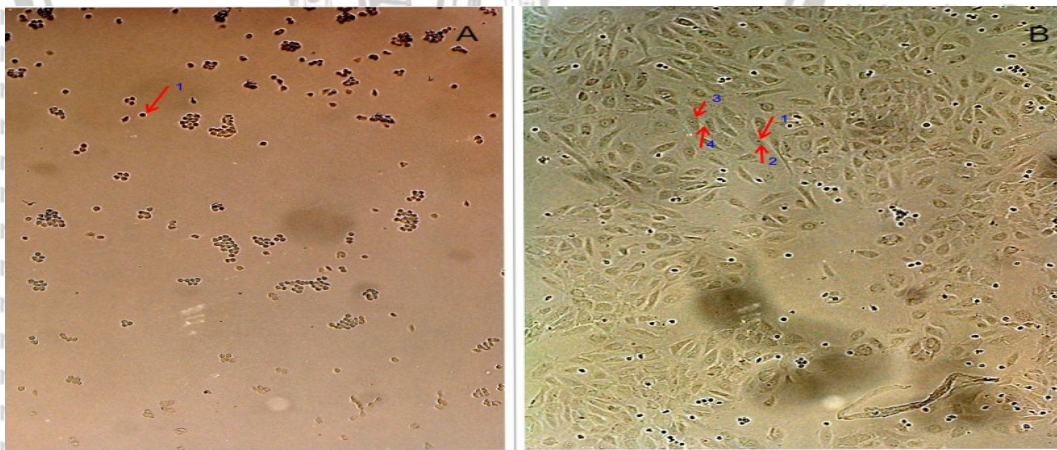
5.1 Karakteristik Sampel

Sampel sel endotel diperoleh dari tali pusat bayi yang dilahirkan secara SC di Rumah Sakit Permata Bunda Malang. Pemilihan sampel berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi dari diagnosa sebelum dilakukan SC dan setelah bayi lahir.

Sel HUVECS digunakan sebagai sampel penelitian secara *in vitro* karena sel HUVECs sesuai untuk meneliti kondisi Disfungsi Endotel. Penelitian ini dilakukan dengan menganalisa viabilitas sel, kadar NO, dan Kadar MDA.

5.2 Hasil Kultur Sel Endotel Tali Pusat

Kultur endotel tali pusat dilakukan selama 72 jam untuk yang menggunakan plate 96. Dan 96 jam untuk plate 24. Pemanenan dilakukan setelah sel konvluen 70 - 80 persen. Plate 96 digunakan untuk melihat viabilitas sel sedangkan plate 24 untuk melihat kadar NO dan MDA. Hasil pengamatan kultur sel endotel dapat dilihat pada Gambar 5.1

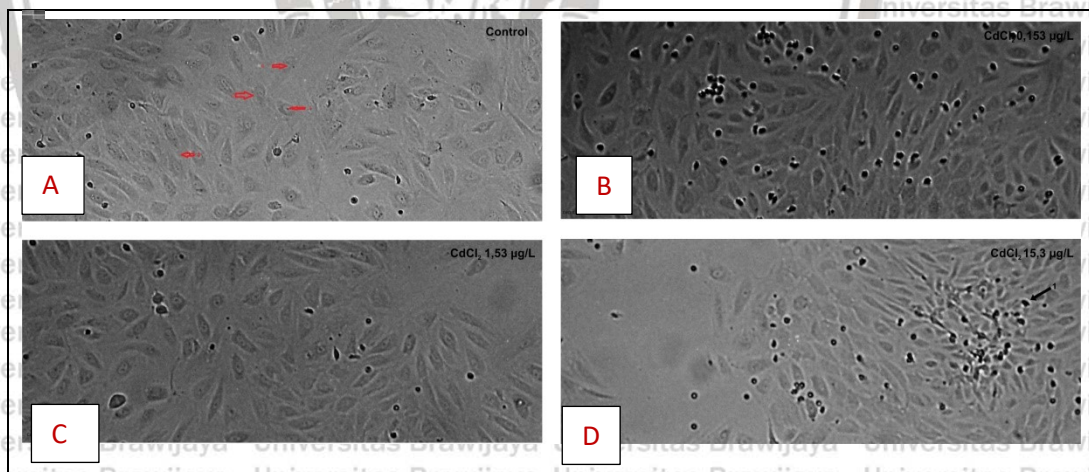


Gambar 5.1 Pengamatan Kultur Sel Endotel: (a) hari pertama, tampak sel dalam *plate* kultur, 1. sel endotel (b) setelah 96 jam kultur, tampak sel hampir memenuhi seluruh lapang pandang. Sel tampak semakin bertambah jumlahnya, dan mulai saling menempel satu sel dengan sel yang lain, sel mencapai tahap konfluensi. 1. inti sel 2. sitoplasma 3. membran plasma 4. matriks ekstraseluler Pengamatan menggunakan *inverted microscope* (100x), tanpa pewarnaan.

Pada hari pertama ditemukan sel endotel yang merupakan cikal bakal dari sel HUVECs. Pada hari ketiga dan keempat didapatkan konfluensi 70% dengan sel HUVECs monolayer primer, dan ada bentukan cobble stone dengan ciri khas sel berbentuk pipih, bulat, memiliki jarak yang teratur dan rapat. Di dalam sel terdapat inti sel, membran plasma, sitoplasma dan matriks ekstra seluler.

5.3 Pengaruh CdCl₂ terhadap Morfologi Sel Endotel HUVECs

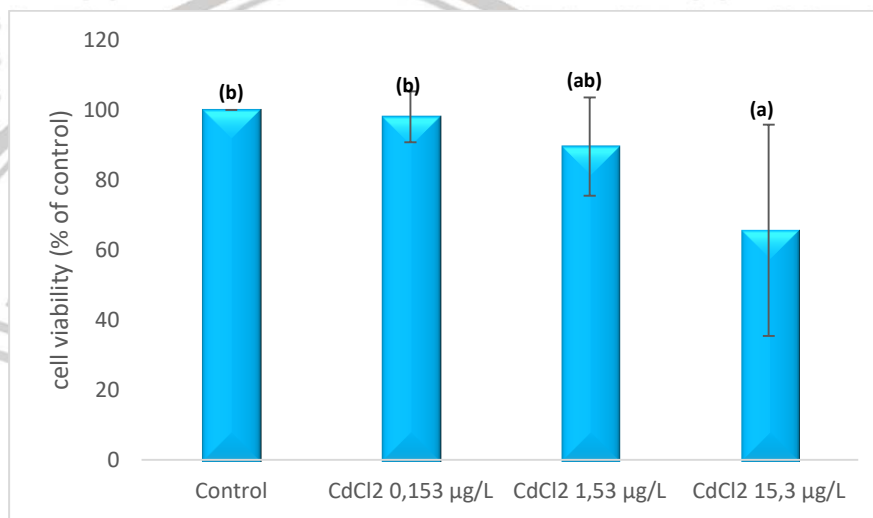
Persentase Viabilitas sel endotel menurun dengan induksi CdCl₂. Induksi CdCl₂ pada konsentrasi 0,153 µg/L, 1,53 µg/L, dan 15,3 µg/L menunjukkan semakin besar konsentrasi induksi dari CdCl₂ semakin menurunkan viabilitas sel endotel. Penelitian pendahuluan dilakukan dalam waktu 48 jam. Gambar pada konsentrasi CdCl₂ 15,3 µg/L terlihat bentuk morfologinya berbeda dibanding konsentrasi di bawahnya maupun kontrol.



Gambar 5.2 Pengamatan Morfologi Sel Endotel Yang Dipapar CdCl₂: (A) Kontrol Negatif .1.inti sel 2.sitoplasma 3.membran plasma 4.matriks ekstraseluler,(B) Konsentrasi CdCl₂ 0,153 µg/L, (C) Konsentrasi CdCl₂ 1,53 µg/L, (D) Konsentrasi CdCl₂ 15,3 µg/L. 1. Batas antar sel mulai tidak jelas. Pengamatan menggunakan *inverted microscope* (100x), tanpa pewarnaan

5.4 Pengaruh CdCl₂ terhadap Viabilitas Sel Endotel HUVECs

Uji statistik non parametrik Kruskal Wallis didapatkan statistik uji *Chi Square* sebesar 8.583 dengan probabilitas sebesar 0,035. Yang berarti ada perbedaan pengaruh yang signifikan. Dilanjutkan uji statistik *Mann-Whitney* dengan kriteria bahwa apabila satu pasang menghasilkan probabilitas \leq *level of significance* (alpha = 5%). Untuk mengetahui pengaruh konsentrasi kadmium terhadap viabilitas sel endotel pada HUVECs yang dipapar oleh CdCl₂ yang berbeda signifikan antar kelompok.



Gambar 5.3 Pengukuran Viabilitas Pada Kultur sel HUVECs yang Diinduksi Berbagai Konsentrasi CdCl₂: Kontrol (Tanpa CdCl₂), CdCl₂ 0,153 µg/L, CdCl₂ 1,53 µg/L, CdCl₂ 15,3 µg/L. Data disajikan sebagai rata-rata ± SEM. Semakin tinggi konsentrasi semakin rendah viabilitas sel. Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang bermakna. $p < 0.05$

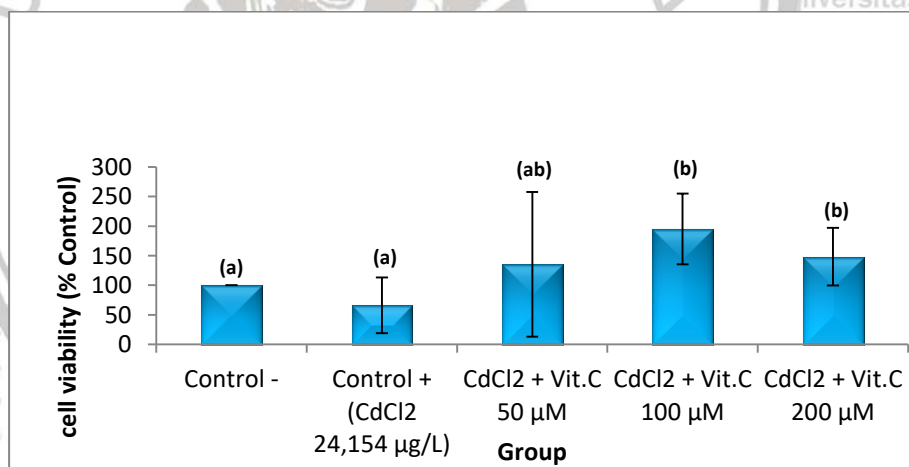
Hasil analisis di atas menginformasikan bahwa kelompok sel yang tidak diberikan kadmium/kontrol (100.00 ± 00) memiliki viabilitas sel yang paling tinggi dan berbeda signifikan dengan viabilitas kelompok sel yang diberikan kadmium dengan konsentrasi 1,53 µg/L (89.55 ± 14.07) dan 15,3 µg/L (65.56 ± 30.23). Namun tidak berbeda signifikan dengan viabilitas kelompok sel yang diberikan kadmium dengan konsentrasi 0,153 µg/L (98.05 ± 7.24).

Sedangkan kelompok sel yang diberikan konsentrasi 15.3 µg/L memiliki viabilitas sel yang paling rendah dan berbeda signifikan dengan viabilitas

kelompok sel yang tidak diberikan kadmium dan kelompok sel yang diberikan kadmium dengan konsentrasi 0,153 µg/L. Namun tidak berbeda signifikan dengan viabilitas kelompok sel yang diberikan kadmium dengan konsentrasi 0,153 µg/L dan 1,53 µg/L.

5.5 Pengaruh Vitamin C terhadap Viabilitas Sel Endotel pada HUVECs yang Diinduksi oleh CdCl₂

Uji statistik uji beda Kruskal Wallis dapat disimpulkan bahwa minimal ada satu pasang perlakuan pemberian Vitamin C yang menghasilkan beda signifikan pada viabilitas sel endotel pada HUVEC yang diinduksi oleh CdCl₂. Untuk mengetahui kelompok yang berbeda signifikan dilanjutkan uji Post Hoc menggunakan *Mann-Whitney* dengan kriteria bahwa apabila satu pasang pemberian Vitamin C menghasilkan probabilitas \leq level of significance (alpha = 5%) maka dapat dinyatakan terdapat perbedaan pengaruh pemberian Vitamin C terhadap viabilitas sel endotel pada HUVEC yang dipapar oleh CdCl₂.



Gambar 5.4 Pengukuran Viabilitas sel Pengaruh Vit.C pada sel HUVECs yang Diinduksi CdCl₂: Kontrol Negatif (Tanpa CdCl₂), Kontrol Positif LD.50 CdCl₂ (24,154µg/L),LD.50 CdCl₂ + Vit.C 50 µM, LD.50 CdCl₂ +Vit.C 100 µM,LD.50 CdCl₂+Vit.C 200 µM. Data disajikan sebagai rata-rata ± SEM. Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan (p ≤ 0.05)

Berdasarkan diagram pengaruh Vitamin C terhadap Viabilitas Sel Endotel HUVECs yang diinduksi CdCl₂, dapat diketahui bahwa kelompok sel endotel pada HUVEC yang tidak mendapatkan paparan kadmium dan Vitamin C (Control

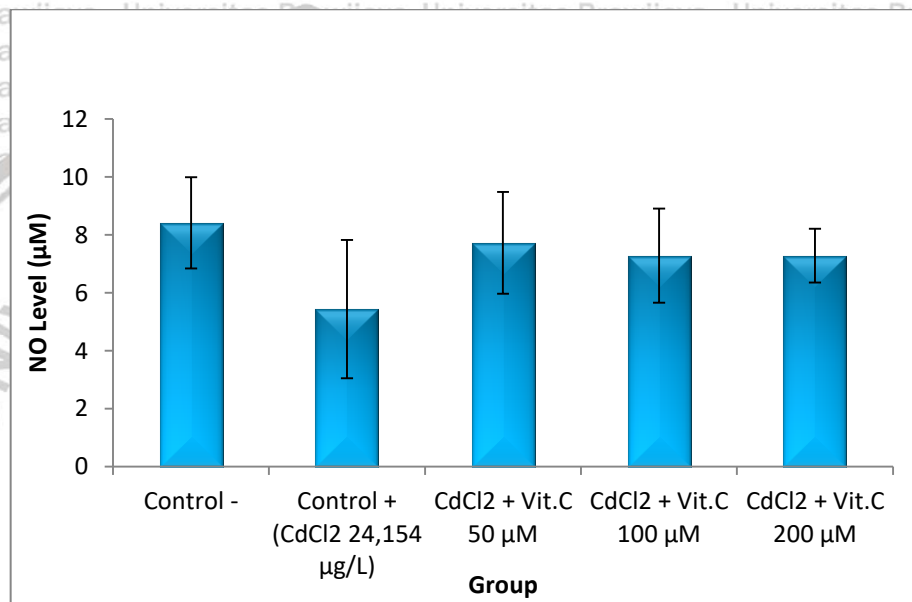
-) memiliki rata-rata viabilitas sebesar $100,00 \pm 0,00$ %, Kemudian kelompok sel endotel pada HUVEC yang mendapatkan paparan kadmium (Control +) memiliki rata-rata viabilitas sebesar $66,13 \pm 46,89$ %. Sedangkan kelompok sel endotel pada HUVEC yang mendapatkan paparan kadmium dengan dosis $24,154 \mu\text{g/L}$ dan Vitamin C konsentrasi $50 \mu\text{M}$ memiliki rata-rata viabilitas sebesar $135,48 \pm 122,22$ %. Sementara kelompok sel endotel pada HUVEC yang mendapatkan paparan kadmium dengan konsentrasi $24,154 \mu\text{g/L}$ dan Vitamin C konsentrasi $100 \mu\text{M}$ memiliki rata-rata viabilitas sebesar $195,16 \pm 59,69$ % Dan rata-rata viabilitas kelompok sel endotel pada HUVEC yang mendapatkan paparan kadmium dengan konsentrasi $24,154 \mu\text{g/L}$ dan Vitamin C konsentrasi $200 \mu\text{M}$ sebesar $148,39 \pm 48,52$ %.

Hasil analisis di atas menginformasikan bahwa kelompok sel endotel pada HUVEC yang mendapatkan paparan kadmium dengan konsentrasi $24,154 \mu\text{g/L}$ dan Vitamin C konsentrasi $100 \mu\text{M}$ memiliki viabilitas sel yang paling tinggi dan berbeda signifikan dengan kelompok sel endotel pada HUVEC yang tidak mendapatkan paparan kadmium dan Vitamin C (Control -) dan kelompok sel endotel pada HUVEC yang mendapatkan paparan kadmium (Control +). Namun tidak berbeda signifikan dengan kelompok sel endotel pada HUVEC yang mendapatkan paparan kadmium dengan konsentrasi $24,154 \mu\text{g/L}$ dan Vitamin C konsentrasi $50 \mu\text{M}$ dan kelompok sel endotel pada HUVEC yang mendapatkan paparan kadmium dengan konsentrasi $24,154 \mu\text{g/L}$ dan Vitamin C konsentrasi $200 \mu\text{M}$.

Sedangkan kelompok sel endotel pada HUVEC yang mendapatkan paparan kadmium (Control +) memiliki viabilitas sel yang paling rendah dan berbeda signifikan dengan kelompok sel endotel pada HUVEC yang mendapatkan paparan kadmium dengan konsentrasi $24,154 \mu\text{g/L}$ dan Vitamin C konsentrasi $100 \mu\text{M}$ dan kelompok sel endotel pada HUVEC yang mendapatkan

paparan kadmium dengan konsentrasi 24,154 µg/L dan Vitamin C 200 µM. Namun tidak berbeda signifikan dengan kelompok sel endotel pada HUVEC yang tidak mendapatkan paparan kadmium dan Vitamin C (Control -) dan kelompok sel endotel pada HUVEC yang mendapatkan paparan kadmium dengan konsentrasi 24,154 µg/L dan Vitamin C 50 µM.

5.6 Pengaruh Pemberian Vitamin C pada Kadar NO HUVECs yang Diinduksi oleh CdCl₂



Gambar 5.5 Pengukuran Kadar NO pada medium HUVECs. Pengaruh Vit.C pada HUVECs yang Diinduksi CdCl₂: Kontrol Negatif (Tanpa CdCl₂), Kontrol Positif CdCl₂ (24,154µg/L), CdCl₂ + Vit.C 50 µM, CdCl₂ +Vit.C 100 µM,LD.50 CdCl₂+Vit.C 200 µM. Data disajikan sebagai rata-rata ± SEM.Vitamin C meningkatkan kadar NO.(p ≤ 0.05).

Berdasarkan diagram Pengaruh Vitamin C terhadap Kadar NO HUVECs yang diinduksi CdCl₂, dapat diketahui bahwa kelompok sel endotel pada HUVEC yang tidak mendapatkan paparan kadmium dan Vitamin C (Control -) memiliki rata-rata kadar NO sebesar 8,413 ± 1,572 µM. Kemudian kelompok sel endotel pada HUVEC yang mendapatkan paparan kadmium (Control +) memiliki rata-rata kadar NO sebesar 5,433 ± 2,385 µM. Sedangkan kelompok sel endotel pada HUVEC yang mendapatkan paparan kadmium dengan konsentrasi 24,154 µg/L dan Vitamin C konsentrasi 50 µM memiliki rata-rata kadar NO sebesar 7,721 ±

1,753 μM . Sementara kelompok sel endotel pada HUVEC yang mendapatkan paparan kadmium dengan konsentrasi 24,154 $\mu\text{g/L}$ dan Vitamin C konsentrasi 100 μM memiliki rata-rata kadar NO sebesar $7,279 \pm 1,628 \mu\text{M}$. Dan rata-rata kadar NO kelompok sel endotel pada HUVEC yang mendapatkan paparan kadmium dengan konsentrasi 24,154 $\mu\text{g/L}$ dan Vitamin C 200 μM sebesar $7.279 \pm 0.923 \mu\text{M}$.

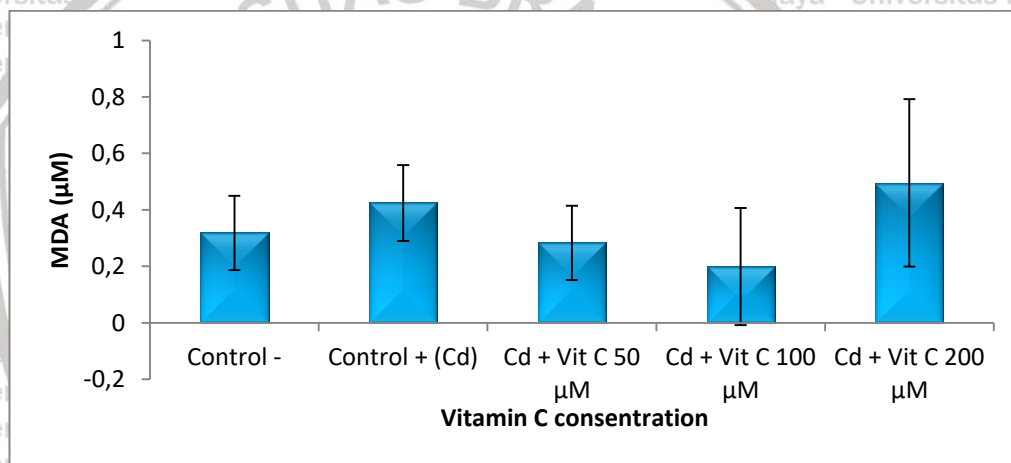
Hasil analisis di atas menginformasikan bahwa kelompok sel endotel pada HUVEC yang tidak mendapatkan paparan kadmium dan Vitamin C (Control-) memiliki kadar NO sel yang paling tinggi namun tidak berbeda signifikan dengan kelompok sel endotel pada HUVEC yang mendapatkan paparan kadmium (Control +), kelompok sel endotel pada HUVEC yang mendapatkan paparan kadmium dengan konsentrasi 24,154 $\mu\text{g/L}$ dan Vitamin C 50 μM , kelompok sel endotel pada HUVEC yang mendapatkan paparan kadmium dengan konsentrasi 24,154 $\mu\text{g/L}$ dan Vitamin C 100 μM dan kelompok sel endotel pada HUVEC yang mendapatkan paparan kadmium dengan konsentrasi 24,154 $\mu\text{g/L}$ dan Vitamin C 200 μM . Sedangkan kelompok sel endotel pada HUVEC yang mendapatkan paparan kadmium (Control+) memiliki kadar NO sel yang paling rendah namun tidak berbeda signifikan dengan kadar NO pada perlakuan yang lainnya.

Sebelum dilakukan uji beda dilakukan pengujian normalitas residual dan homogenitas residual. Hasil pengujian normalitas residual pengaruh pemberian Vitamin C terhadap kadar NO sel endotel pada HUVEC yang dipapar oleh CdCl_2 menghasilkan statistik *Shapiro-Wilk* sebesar 0,940 dengan probabilitas sebesar 0,149. Sehingga disimpulkan normalitas residual tersebut dinyatakan normal. Dilanjutkan dengan uji Homogenitas.

dinyatakan memiliki ragam yang homogen. Setelah diketahui uji normalitas residual maupun homogenitas residual normal maka memenuhi uji beda menggunakan One Way Anova

Hasil pengujian perbedaan pengaruh pemberian Vitamin C terhadap kadar NO sel endotel pada HUVEC yang dipapar oleh CdCl₂ statistik uji F sebesar 2,068 dengan probabilitas sebesar 0,123 sehingga disimpulkan tidak terdapat perbedaan pengaruh yang signifikan pemberian Vitamin C terhadap kadar NO sel endotel pada HUVEC yang dipapar oleh CdCl₂.

5.7 Pengaruh Vitamin C pada Kadar MDA HUVECs yang Diinduksi oleh CdCl₂



Gambar 5.6 Pengukuran Kadar MDA pada sel HUVECs. Pengaruh Vit.C pada HUVECs yang Diinduksi CdCl₂: Kontrol Negatif (Tanpa CdCl₂), Kontrol Positif CdCl₂ (24,154µg/L), CdCl₂ + Vit.C 50 µM, CdCl₂ +Vit.C 100 µM, CdCl₂+Vit.C 200 µM. Data disajikan sebagai rata-rata ± SEM. Semakin tinggi konsentrasi Vitamin C MDA menurun namun meningkat lagi pada konsentrasi yang lebih tinggi. (p≤ 0.05)

Berdasarkan diagram pengaruh Vitamin C terhadap Kadar MDA HUVECS yang diinduksi CdCl₂, dapat diketahui bahwa kelompok sel endotel pada HUVEC yang tidak mendapatkan paparan kadmium dan Vitamin C (Control -) memiliki rata-rata kadar MDA sebesar 0,32 ± 0,13 µM. Kemudian kelompok sel endotel pada HUVEC yang mendapatkan paparan kadmium (Control +) memiliki rata-rata kadar MDA 0,42 ± 0,13 µM. Sedangkan kelompok sel endotel pada HUVEC yang

mendapatkan paparan kadmium dengan konsentrasi 24,154 µg/L dan Vitamin C 50 µM memiliki rata-rata kadar MDA sebesar $0,28 \pm 0,13$ µM. Sementara kelompok sel endotel pada HUVEC yang mendapatkan paparan kadmium dengan konsentrasi 24,154 µg/L dan Vitamin C konsentrasin 100 µM memiliki rata-rata kadar MDA sebesar $0,19 \pm 0,21$ µM.

Dan rata-rata kadar MDA kelompok sel endotel pada HUVEC yang mendapatkan paparan kadmium dengan konsentrasi 24,154 µg/L dan Vitamin C konsentrasi 200 µM sebesar $0,49 \pm 0,29$ µM.

Hasil analisis di atas menginformasikan bahwa kelompok sel endotel pada HUVEC yang mendapatkan paparan kadmium dengan konsentrasi 24,154 µg/L dan Vitamin C konsentrasi 200 µM memiliki kadar MDA sel yang paling tinggi namun tidak berbeda signifikan dengan kelompok sel endotel pada HUVEC yang tidak mendapatkan paparan kadmium dan Vitamin C (Control -), kelompok sel endotel pada HUVEC yang mendapatkan paparan kadmium (Control +), kelompok sel endotel pada HUVEC yang mendapatkan paparan kadmium dengan konsentrasi 24,154 µg/L dan Vitamin C 50 µM, dan kelompok sel endotel pada HUVEC yang mendapatkan paparan kadmium dengan konsentrasi 24,154 µg/L dan Vitamin C 100 µM. Sedangkan kelompok sel endotel pada HUVEC yang mendapatkan paparan kadmium dengan konsentrasi 24,154 µg/L dan Vitamin C 100 µM memiliki kadar MDA sel yang paling rendah namun tidak berbeda signifikan dengan kadar MDA pada perlakuan yang lainnya.

Untuk melakukan uji pengaruh pemberian Vitamin C Terhadap Kadar MDA HUVECs yang dipapar CdCl₂ dilakukan uji normalitas residual dan homogenitas residual terlebih dahulu. Karena normalitas residual dan homogenitas residual yang memenuhi syarat sehingga bisa uji beda dengan menggunakan One Way Anova. Hasil Uji One Way Anova menghasilkan statistik uji F sebesar 1,872

dengan probabilitas sebesar 0,155. Sehingga disimpulkan tidak terdapat perbedaan pengaruh yang signifikan pemberian Vitamin C terhadap kadar MDA sel endotel pada HUVEC yang dipapar oleh CdCl₂.





BAB 6 PEMBAHASAN

6.1 Pengaruh Kadmium

Kadmium (Cd) merupakan logam berat yang banyak ditemui. Logam digunakan untuk bahan industri antara lain zat pewarna, baterai dsb. Dalam tubuh Cd menyebabkan intoksifikasi dan menyebabkan masalah kesehatan, antara lain kesehatan vaskular seperti yang diteliti oleh Lee et al pada orang korea, hasil penelitiannya menyatakan bahwa rata-rata kadar 1,53 µg/L Cd dalam darah memiliki potensi gangguan vaskular utamanya kardiovaskular dan hipertensi.

Pada penelitian bertujuan untuk mengetahui pengaruh paparan Cd dosis rendah terhadap fungsi endotel. Dosis Cd pada penelitian merujuk pada penelitian yang dilakukan oleh Lee et al dan beberapa range konsentrasi yakni 0,153 µg/L, 1,53 µg/L, 15,3 µg/L yang selanjutnya menggunakan analisis probit untuk mendapatkan LD₅₀ konsentrasi CdCl₂. Penelitian pendahuluan mengungkap lebih jauh efek paparan konsentrasi rendah CdCl₂ terhadap kelainan vaskuler dilihat melalui disfungsi endotel dengan marker viabilitas sel. Penelitian lanjutan untuk melihat pengaruh Vitamin C terhadap viabilitas sel dan disfungsi endotel pada HUVECs yang dipapar CdCl₂ yang dilihat dari kadar NO dan MDA.

6.2 Pengaruh Cd terhadap Morfologi Sel Endotel

HUVECs adalah sel yang dikultur dari vena tali pusat bayi yang digunakan secara luas dalam penelitian di bidang vaskuler, baik fisiologi maupun patofisiologi. HUVECs yang normal memiliki ciri morfologi sel endotel berbentuk cobblestone dengan ciri spesifik sel yang berbentuk pipih dengan jarak yang teratur serta bagian tengah bulat terang dan monolayer. Terdiri dari inti sel, sitoplasma, membran sel dan matriks ekstraseluler (Arjita, et al., 2002; Sarbini, et al., 2011), kontak antar sel terlihat jelas (Baktiyani, et al., 2007). Sedangkan

HUVECs yang abnormal memiliki ciri sel yang shrinkage dan tampak adanya vakuola (Baktiyani, *et al.*, 2007), mengalami penurunan kerapatan dan bentuknya ireguler (Duan, 2013).

Pada penelitian kami morfologi sel HUVECs normal tanpa paparan sesuai dengan penelitian sarbini *et al* pada tahun 2011. Namun HUVECs yang mendapat paparan CdCl_2 pada konsentrasi 0,153 $\mu\text{g/L}$ dan 1,53 $\mu\text{g/L}$ hampir sama penampakan morfologinya dengan HUVECs normal. Paparan CdCl_2 15,3 $\mu\text{g/L}$ mulai nampak menurunnya kerapatan dari sel endotel dan mengalami bentuk yang mulai ireguler. Semakin tinggi konsentrasi CdCl_2 semakin tidak terlihat jelas bentuk pipih dan coblestone. Hal itu tampak pada konsentrasi LD.50 CdCl_2 yakni 24,154 $\mu\text{g/L}$. Menurut Nagarajan *et al.* Induksi Cd pada konsentrasi rendah mengubah bentuk morfologi sel dengan mengubahnya menjadi bentuk rounded diduga karena ada depolymerization protein hanya sedikit saja yang selnya mengalami kematian.

Perbedaan morfologi antara sel Huvecs normal dan Huvecs yang diinduksi CdCl_2 ini mungkin berkaitan dengan mekanisme kerja dari Cd yang dapat menginduksi ROS yang berefek pada disfungsi mitokondria. Dimana disfungsi mitokondria ini ditandai dengan meningkatnya permeabilitas mitokondria

6.3 Pengaruh Kadmium terhadap viabilitas sel

Pada induksi CdCl_2 selama 48 jam terdapat penurunan viabilitas sel, Kadar NO dan Peningkatan kadar MDA. Induksi kadmium menyebabkan peningkatan ROS dengan berbagai mekanisme melalui reaksi fenton menyebabkan stress oksidatif dengan melepaskan logam aktif redoks dari sitoplasma dan protein membran sehingga terjadi peningkatan ion besi yang tak terikat (Waisberg, *et a.*, 2003). Pengikatan Cd dengan semi-ubiquinon dan sitokrom b kompleks III mitokondria menyebabkan transport rantai elektron

terganggu sehingga membentuk O_2^- (Wang *et al.*, 2004). Penurunan GSH selular dan Sulfidril binding protein akibat toksisitas Cd menyebabkan ketidakseimbangan redoks sehingga meningkatkan produksi O_2^- , H_2O_2 dan OH (Bagchi, *et al.*, 1997; Liu & Jan, 2000)

Induksi Cd pada tingkat seluler dapat dapat merusak proliferasi dan siklus sel bahkan menyebabkan kematian sel (Templeton & Liu, 2010). Menurut Messner and Bernhard dari berbagai penelitian Kematian sel akibat induksi Cd diawali dengan perubahan fungsi sel endotel yang ditandai dengan meningkatnya permeabilitas endotel yang menyebabkan gangguan integritas endotel yang berperan pada disfungsi vaskular. Sejalan dengan penelitian kami induksi Cd menurunkan viabilitas sel endotel. Sama dengan penelitian yang dilakukan oleh Messner *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2011 Berbagai mekanisme digunakan untuk mengungkap penyebab kematian akibat induksi Cd ini antara lain kerusakan DNA (Liu & Jan, 2000), Produksi ROS (Yang, *et al.*, 2007), Peningatan ceramides dan ativasi calpain (Lee & Thevenod, 2008), Depolarisasi mitokondria (Messner, *et al.*, 2009), Stres Retikulum Endoplasma (wang, *et al.*, 2009).

6.4. Pengaruh Kadmium terhadap kadar NO

Regulasi pembuluh darah diatur oleh NO yang diproduksi HUVECs melalui eNOS (Gimbrone & Garcia-Cardena, 2016). Penghambatan eNOS oleh Cd dapat menyebabkan disfungsi endotel (Kolluru, *et al.*, 2006). Penelitian Nagarajan *et al.*, 2013 menunjukkan Induksi Cd meningkatkan H_2O_2 dan O_2^- dan menurunkan kadar NO. Chanel calsium diblok oleh induksi Cd akibat dari rendahnya calcium menyebabkan eNOS inaktif (Li, *et al.*, 2012) Induksi $CdCl_2$ 24,154 $\mu g/L$ menurunkan kadar NO HUVECs pada penelitian kami. Paparan Cd dosis rendah

100 dan 200 nmol/L menyebabkan penurunan NO (Majumder, *et al.*, 2008).

Induksi Cd meningkatkan O₂⁻ yang merupakan NO scavenger sehingga terbentuk peroxynitrit.

6.5 Pengaruh Kadmium terhadap Kadar MDA

Salah satu manifestasi dari stress oksidatif adalah peroksidasi lipid.

Dimana nucleid acid, lipid dan protein bereaksi dengan lipid peroxy radical dan terjadi proses oksidasi pada substratnya. Membran sel yang terdiri dari poly unsaturated fatty acid sangat rentan terhadap serangan oksidatif yang berakibat mengalami perubahan pada permeabilitas dan fluiditas membran serta fungsi metabolisme selular (Sharma, *et al.*, 2012). Peroksidasi lipid terbentuk melalui interaksi sulfhydryl (-SH) dari GSH akibat stress oksidatif yang diinduksi oleh kadmium (Eybl, *et al.*, 2004). Cd ini memicu produksi ROS (OH⁻) yang mana bila berinteraksi dengan PUFA akan menyebabkan peroksidasi lipid. Salah satu hasil sampingan peroksidasi lipid adalah malondialdehid (MDA). Pada penelitian, ditemukan peningkatan kadar MDA pada sel endotel yang diinduksi Cd, Kadar MDA lebih tinggi dibandingkan kelompok normal sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Kumar, *et al.*, 2009; Elmalah, *et al.*, 2017.

6.6 Pengaruh Vitamin C terhadap Viabilitas Sel HUVECs yang diinduksi CdCl₂

Pada kelompok yang diberi Vitamin C dengan konsentrasi 50, 100, dan 200 µM memiliki viabilitas sel yang lebih tinggi dibandingkan kontrol sehingga dapat diasumsikan pemberian Vitamin C mencegah kematian sel akibat induksi Cd.

Penelitian yang dilakukan pada testis tikus yang diinduksi Cd dan mendapat pretreatment Vitamin C didapatkan kematian selnya lebih rendah dibanding tanpa pretreatment Vitamin C (Ji, *et al.*, 2012). Vitamin C ini memiliki sifat yang

konfrontatif pada konsentrasi yang rendah ia memiliki sifat antioksidan mencegah oksidasi dan menghambat apoptosis. Pada Pemberian Vitamin C dengan konsentrasi 100 μM mampu menurunkan apoptosis pada HUVECs yang dipapar glukosa tinggi (Ho, *et al.*,1999) Di sisi lain semakin tinggi konsentrasi Vitamin C HUVECs yang diinduksi CdCl_2 mengalami penurunan Viabilitas sel. Penulis memperkirakan konsentrasi tinggi vitamin C memiliki sifat prooksidan sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Park *et al.* Tahun 2004 dimana konsentrasi Vitamin C 0,25 – 1 mM mampu menginduksi terjadinya apoptosis pada AML sel line.

6.7 Pengaruh Vitamin C terhadap Kadar NO HUVECs yang diinduksi CdCl_2

Pemberian Vitamin C menurunkan produksi superoksida pada dosis tertentu, mekanisme yang mungkin terjadi adalah kemampuan vitamin c sebagai antioksidan ,Maintain GSH dan redox balance (Donpuha *et al.*,2011). Pada penelitian kami pretreatmen Vitamin C pada HUVECs yang diinduksi CdCl_2 dengan konsentrasi Vitamin C 50,100,200 μM mengalami peningkatan NO dibandingkan kontrol. Pemberian Vitamin C dapat meningkatkan produksi eNOS dengan mencegah terbentuknya eNOS uncouple sehingga tidak terbentuk peroxynitrite (Alkokar *et al.*,2017). Inkubasi 100 μM Vitamin C pada HUVECs mampu meningkatkan aktivitas eNOS (Larduner, *et al.*,2012). Pemberian 100 μM Vitamin C dapat meningkatkan kadar NO pada HUVECs hiperglikemia (Hotima, *et al.*,2003) Vitamin C meningkatkan fosforilasi serin yang mengaktifkan eNOS dengan upregulasi Akt atau AMPK atau menghambat PP2A dengan mengurangi dephosphorylation (Ludke, *et al.*,2012).

6.8 Pengaruh Vitamin C terhadap Kadar MDA HUVECS yang diinduksi CdCl_2

Pemberian Vitamin C 50 dan 100 μM mampu menurunkan kadar MDA sel Huvecs yang diinduksi Cd. Sama dengan penelitian Yan *et al* tahun 2015 yang

menyatakan bahwa vitamin C mampu menurunkan MDA. Vitamin C 100 μM menurunkan kadar MDA HUVECs hiperglikemia (Khotima,2003), Hal ini disebabkan karena Vitamin C mampu menjadi donor untuk menetralkan OH yang merupakan bagian dari ROS (Padayatty, *et al.*, 2003). Namun pada penelitian kami konsentrasi 200 μM vitamin C malah meningkatkan MDA hal ini dimungkinkan karena pada konsentrasi yang lebih tinggi Vitamin C menginduksi H_2O_2 yang mana berakibat terjadinya peroksidasi lipid.(Park, *et al.*,2004; Siddique, *et al.*,2012).

Pada penelitian ini ada peningkatan kadar NO dan penurunan MDA namun tidak signifikan. Ada beberapa hal yang diperkirakan menjadi penyebabnya antara lain jumlah data yang kurang banyak, adanya aksi interaksi antara CdCl_2 dan Vitamin C, faktor konsentrasi vitamin C dan waktu pemberian. Keterbatasan dari penelitian ini adalah tidak adanya pemeriksaan viabilitas sel, kadar NO dan MDA pada Vitamin C murni sehingga tidak bisa dianalisis pengaruh Vitamin C saja.





BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

1. Penelitian pendahuluan induksi CdCl₂ dengan konsentrasi 0,153, 1,53, dan 15,3 pada HUVECs didapatkan LD₅₀ 24,154 µg/L
2. Induksi CdCl₂ pada penelitian pendahuluan mampu menurunkan viabilitas sel dan mengubah morfologi sel endotel penurunan viabilitas yang signifikan pada konsentrasi 15,3 µg/L dan perubahan morfologi mulai tampak pada konsentrasi 15,3 µg/L
3. Vitamin C pada konsentrasi 100 µM mampu menstimulus peningkatan viabilitas sel.
4. Vitamin C pada konsentrasi 50,100,200 µM mampu meningkatkan kadar NO.
5. Vitamin C pada Konsentrasi 50 dan 100 µM mampu menurunkan kadar MDA.

7.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian dengan waktu yang lebih lama secara *in vitro* dan penelitian secara *in vivo* untuk mengetahui efektivitas vitamin C untuk preventif penyakit kardiovaskuler yang disebabkan logam berat kadmium.
2. Perlu dilakukan penelitian menggunakan parameter yang berbeda misalnya pada jalur inflamasi untuk melihat efek vitamin C sebagai antioksidan yang dapat menghambat toksisitas kadmium.

DAFTAR PUSTAKA

- Aalbers Th.G., Houtman J.P.W., 1985. Relationships between trace elements and atherosclerosis. *Science of The Total Environment* (43)3
- Abernethy D.R., DeStefano A.J., Cecil T.L., Zaidi K., Williams R.L., USP Metal Impurities Advisory Panel. 2010. Metal Impurities in Food and Drugs. 7 (5): 750-755
- Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G., 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* ;357:593–615
- Alissa E.M, Ferns G.A., 2011 Heavy metal poisoning and cardiovascular disease. *Journal of toxicology.* 2011:870125.
- Alkokar G, Baghchi AK, Dias DDS, de Angelis K, Jassal D, Singal PK. 2016 Mitigation of nitrosative stress and inflammation by Vitamin C in cardiomyopathy. *The FASEB Journal.* 2016 ;30
- Arjita, I.P.D., Widodo, M.A., Widjajanto, E. 2002. Pengaruh Kadar Glukosa Tinggi Terhadap Sintesis Nitric Oxide dari Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEs) Culture dengan Tehnik Bioassay. *Biosain, Vol., No. 1, April 2002*
- ATSDR, 2012. TOXICOLOGICAL PROFILE FOR CADMIUM, e U.S. Department of Health and Human Service, Atlanta, Georgia
- Ayala A., Munoz M.F., Arguelles S., 2014. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonena, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* Volume 2014 (2014) article ID 360438.31 doi: 10.1155/2014/360438
- Aziz M., Ghareeb D., Eweda S., Hussien H., Demellawy M.E., 2015. Immunomodulatory effect of Berberis vulgaris extracts on murine splenocytes and enrichment of dendritic cells in vitro, *Biotechnology & Biotechnological Equipment,* 29:6 , 1149 – 1155
- Bagchi D, Vuchetich PJ, Bagchi M, Hassoun EA, Tran MX, Tang L, Stohs SJ., 1997. Induction of oxidative stress by chronic administration of sodium dichromate and cadmium chloride to rats. *Free Radic Biol Med.* 22:471–478
- Baktiyani S.C.W. 2007. THE INFLUENCE OF THE COMBINATION OF NAC WITH VITAMIN C AND E TO OXIDATIVE STRESS ON HUVECS EXPOSED WITH ECLAMPSIA PLASMA. *Jurnal Kedokteran Brawijaya.* 23 (3)
- Baudin B, Bruneel A, Bosselut N, Vaubourdolle M. 2007. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nat Protoc.* 2007;2(3):481-5.

Belyaeva EA, Dymkowska D, Wieckowski MR, Wojtczak L.,2008. Mitochondria as an important target in heavy metal toxicity in rat hepatoma AS-30D cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 231:34–42

Bernhoft R.A.,2013.Cadmium Toxicity and Treatment. *The Scientific World Journal*,Volume 2013

Bielski B.,H.,J, Arudi R.,L., Sutherland M.,W., 1983. A study of the reactivity of HO₂ /O₂ - with unsaturated fatty acids. *Journal of Biological Chemistry* 258:4759-4761.

BioAssay System. 2016. QuantiChrom™ TBAR Assay Kit. www.bioassaysys.com. Downloaded on mei 2017

BioAssy System.2015. CellQuanti-MTT™ Cell Viability Assay Kit (CQMT-500). www.bioassaysys.com. Downloaded on mei 2017

Birben E., Sahiner U.M., Sackesen C., Erzurum S. Kalayci O.,2012. REVIEW ARTICLE Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J.* 2012 Jan; 5(1): 9–19. doi: 10.1097/WOX.0b013e3182439613

Blake J.G., Ridker P.M.,2001. Novel clinical markers of vascular wall inflammation. *Circ Res.* 89:763–71

Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A.2003. Endothelial dysfunction a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*23:168

Borne Y, Barregard L, Persson M, Hedblad B, Fagerberg B, Engstrom G, 2015. Cadmium exposure and incidence of hearth failure and atrial fibrillation: a population-based prospective cohort study.*BMJ Open.* 2015;5(6):e007366

Bressler J.P.,Olivi L., Cheong J.H., Kim Y., Bannona D., 2004. Divalent Metal Transporter 1 in Lead and Cadmium Transport. *Annals of The New York Academy of Science.* 1012:142-52

Bridges CC, Zalups RK.2005. Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005 May 1;204(3):274-308.

Carroll R.E., 1966. The Relationship of Cadmium in the Air to Cardiovascular Disease Death Rates. *JAMA.* 1966;198(3):267-269.

Casalino E, Sblano C, Landriscina C.,1997. Enzyme activity alteration by cadmium administration to rats: the possibility of iron involvement in lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys.* 346:171–179

Casalino E, Sblano C, Landriscina C.,1997. Enzyme activity alteration by cadmium administration to rats: the possibility of iron involvement in lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys.* 346:171–179

Cayman Chemical. Nitrate/Nitrite Calorimetric Assay Kit. www.caymanchem.com.
Downloaded on mei 2017

Chhabra N.,2009. Endothelial dysfunction – A predictor of atherosclerosis.
Internet Journal of Medical Update, Vol. 4, No. 1

Chmielowska-bak J., Gzyl J., Rusinska S.R., Jelunek M.A., Deckert J.,2014. The
new insights into cadmium sensing. *Frontiers in Plant Science*.5: 245
.2014.00245. eCollection 2014

Cuypers A,Plusquin M, Remans T, Jozefczak M, Keunen E, Gielen
H, Opendakker K, Nair AR, Munters E, Artois TJ, Nawrot T, Vangronsveld
J,Smeets K, 2010. Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals*. 23:
927-940

Davis, J., Crampton, S. P., Hughes, C. C. 2007. Isolation of Human Umbilical
Vein Endothelial Cells (HUVEC). *J. Vis. Exp.* (3), e183, doi:10.3791/183.

Dizdaroglu M, Jaruga P..2012. Mechanisms of free radical-induced damage to
DNA. *Free Radic Res.* 2012 Apr;46(4):382-419. doi:
10.3109/10715762.2011.653969.

Donne D I., Scalon A., Glustasini D., Cavvara E., Tell G.,Lurgrella G., Colombo
R., Rossi R., Milzani A., 2005. Protein As Biomarker of Oxidative/
Nitrosative Stress In Disease: The contribution Of Redox Proteomics. *Mass
Spectrometry Review*. 24: pp 53-99

Donpunha W, Kukongviriyapan U, Sompamit K, Pakdeechote P, Kukongviriyapan
V, Pannangpetch P. 2011. Protective effect of ascorbic acid on cadmium-
induced hypertension and vascular dysfunction in mice. *Biometals*. 2011;
24: 105-15.

Dorta DJ, Leite S, DeMarco KC, Prado IM, Rodrigues T, Mingatto FE, Uyemura
SA, Santos AC, Curti C.,2003. A proposed sequence of events for
cadmium-induced mitochondrial impairment. *J Inorg Biochem*. 97:251–257

Duan J, Yu Y, Li Y, Yu Y, Li Y, et al. 2013. Toxic Effect of Silica Nanoparticles on
Endothelial Cells through DNA Damage Response via Chk1-Dependent
G2/M Checkpoint. *PLoS ONE* 8(4): e62087.
doi:10.1371/journal.pone.0062087

Dudzinski D.M., Michel T., 2007. Life history of eNOS: partners and
pathways.*Cardiovascular Research* .75: 247–260

Elmallah MLY, Elkhadragey MF, Al-Olayan EM, Moneim AEA. 2017. Protective
Effect of *Fragaria ananassa* Crude Extract on Cadmium-Induced Lipid
Peroxidation, Antioxidant Enzyme Suppression, and Apoptosis in Rat
Testes. *International Journal of Molecular Science*. 2017; 18:957
doi:10.3390/ijms18050957

Everett C.J., Frithsen I.L., 2008. Association of Urinary cadmium and myocardial
infarction,*Environ. Res*.106

Eybl V, Kotyzova D, Bludovska M.2004. The effect of curcumin on cadmium-induced oxidative damage and trace elements levels in the liver of rats and mice. *Toxicology*. 151:79–85

Federer WT, 1955, *Experimental design: Theory and application*. citation : Hanafiah KA,ed, 2005, *Rancangan percobaan – Teori dan Aplikasi*, 3 th edn. Jakarta: Raja Grafindo Persada, pp.9-10.

Förstermann U. and Münzel T.,2006. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 113: 1708-1714

Forstermann U., Sessa W.C.,2011. Basic science for the clinician Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal* (2012) 33, 829–837 doi:10.1093/eurheartj/eh304

Gimbrone MA, Jr, Garcia-Cardena G. 2016. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circulation Research*. ; 118: 620–636.

Grosicki A.,2004. Influence of Vitamin C on cadmium absorption and distribution in rats, *J Trace Elem Med Biol.* (2):183-7.

Gupta M, Dobashi K, Greene J.K., et al. 1997. Studies on hepatic injury and antioxidant enzyme activities in rat sub-cellular organelles following in vivo ischemia and reperfusion. *Mol Cell Biochem.* 176:337–47

Halder S.R.,Bhattacharyya M., 2014. Oxidative stress: Lipid peroxidation products as predictors in disease progression. *Journal of Experimental and Integrative Medicine.* 4(3): 151-164

Halliwell B., Gutteridge J.M.C., 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219: 1–14

Hauoem S., Hani A.E.,2013.Effect of Cadmium on Lipid Peroxidation and on Some Antioxidants in the Liver, Kidneys and Testes of Rats Given Diet Containing Cadmium-polluted Radish Bulbs. *J Toxicol Pathol.* 2013 Dec; 26(4): 359–364. doi: 10.1293/tox.2013-0025

Henkler F, Brinkmann J, Luch A. 2010. The role of oxidative stress in carcinogenesis induced by metals and xenobiotics. *Cancers* 2:376–396

Ho E, Karimi Galougahi K, Liu CC, Bhindi R, Figtree GA. 2013. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biol.* 8;1:483-91. doi: 10.1016/j.redox.2013.07.006

Huang P.L., 2003.Endothelial nitric oxide synthase and endothelial dysfunction. *Curr Hypertens Rep.* (6):47380

Ji Y, Wang Z, Wang H, Zhang C, Zhang Y, Zhao M, Chen Y, Meng X, Xu D. Ascorbic acid protects against cadmium-induced endoplasmic reticulum stress and germ cell apoptosis in testis. *Reproductive Toxicology.* 2012; 34: 357 – 363.

Katusic Z.S.,2001. Vascular endothelial dysfunction: does tetrahydrobiopterin play a role?. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* (3):H981-6.

Khotimah H., 2003.KETERKAITAN PENGARUH PEMBERIAN VITAMIN E DAN VITAMIN C TERHADAP BIOAVAILABILITAS ENDOTHELIAL-DERIVED NITRIC OXIDE (EDNO), MALONDEALDEHIDE (MDA) DAN KEPADATAN SEL ENDOTEL KULTUR Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) KONDISI GLUKOSA TINGGI, Program Pascasarjana Biomedis. Universitas Brawijaya.Malang.

Klaunig, J.E., Xu, Y., Bachowski, S., Jiang, J., 1997. Free-radical oxygen-induced changes in chemical carcinogenesis. In: Wallace, K.B. (Ed.), *Free Radical Toxicology*. Taylor & Francis, London, pp. 375–400.

Kolluru GK, Tamilarasan KP, Geetha PS, Durgha NP, Chatterjee S.2006.Cadmium induced endothelial dysfunction: consequence of defective migratory pattern of endothelial cells in association with poor nitric oxide availability under cadmium challenge. *Cell Biology International.* 2006; 30:427–438

Krumova K., Cosa G., 2016. Overview of reactive oxygen species. In *Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences*; The Royal Society of Chemistry: London, UK, Chapter 1; Volume 1, pp. 1–21.

Kumar P, Prasad Y, Patra AK, Ranjan R, Swarup D, Patra RC, Pal S.2009. Ascorbic acid, garlic extract and taurine alleviate cadmium –induced oxidative stress in freshwater catfish (*clarias batrachus*). *Science of the Total Enviroment.* 407:5024 – 5030

Kuzkaya N., Weissmann N., Harrison D.G., Dikalov S., 2003. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 278(25):22546-54

Lane N., 2002. *Oxygen, the Molecule That Made the World*. Oxford University Press, Oxford. 384 pp; ISBN 0-19-850803-4

Lee WK, Thevenod F. 2008.Novel roles for ceramides, calpains and caspases in kidney proximal tubule cell apoptosis: lessons from in vitro cadmium toxicity studies. *Biochemical Pharmacology.* 76: 1323–1332.

Lee, M-S., Park, S.K., Hu, H., Lee, S.,2011,Cadmium exposure and cardiovascular disease in the 2005 Korea National Health and Nutrition Examination Survey, *Environ Res.* 2011 January ; 111(1): 171–176. doi:10.1016/j.envres.2010.10.006

Leonard S. S., Harris G. K., Shi X. 2004. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic. Biol. Med.* 12, 1921–1942. 10.1016/j.freeradbiomed.2004.09.010

Li S, Yu J, Zhu M, Zhao F, Luan S. 2012.Cadmium impairs ion homeostasis by altering K⁺ and Ca²⁺ channel activities in rice root hair cells. *Plant Cell Environment.* 35(11): 1998–2013.



Libby P., 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420: 868–874.

Liu F, Jan KY.2000. DNA damage in arsenite- and cadmium-treated bovine aortic endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* 28:55–6

Liu J, Qu W, Kadiiska MB.2009. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009 Aug 1;238(3):209-14. doi: 10.1016/j.taap.2009.01.029.

Ludke A, Sharma AK, Bagchi AK & Singal PK. Subcellular basis of vitamin C protection against doxorubicin-induced changes in rat cardiomyocytes. *Molecular Cell Biochemistry.* 2012; 360: 215-224, DOI: 10.1007/s11010-011-1059-z

Majumder S, Muley A, Kolluru GK, Saurabh S, Tamilarasan KP, Chandrasekhar S, Reddy HB, Purohit S, Chatterjee S. 2008. Cadmium reduces nitric oxide production by impairing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Biochemistry Cell Biology.* 86: 1-10.

Mao W. P., Zhang N. N., Zhou F. Y., Li W. X., Liu H. Y., Feng J., Zhou L., Wei C. J., Pan Y. B., He Z. J., 2011. Cadmium directly induced mitochondrial dysfunction of human embryonic kidney cells. *Hum. Exp. Toxicol.* 30, 920–929

Marchetti C., 2013. Role of Calcium Channels in Heavy Metal Toxicity. *ISRH Toxicology.* Volume 2013(2013) Article ID. 184360.9 page

Menke A, Muntner P, Silbergeld EK, Platz EA, Guallar E. 2009. Cadmium levels in urine and mortality among U.S. adults. *Environ Health Perspect.* 2009 Feb;117(2):190-6. doi: 10.1289/ehp.11236. Epub 2008 Sep 3.

Messner B, Bernhard D.2010. Cadmium and cardiovascular diseases: cell biology, pathophysiology, and epidemiological relevance. *Biometals.* doi:10.1007/s10534-010-9314-4

Messner B, Knoflach M, Seubert A, Ritsch A, Pfaller K, Henderson B, Shen YH, Zeller I, Willeit J, Laufer G, Wick G, Kiechl S, Bernhard D.2009. Cadmium is a novel and independent risk factor for early atherosclerosis mechanisms and in vivo relevance. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 29: 1392–1398.

Messner B, Ploner C, Laufer G, Ringer T, Bernhard D.2012. Cadmium activates a programmed, lysosomal membrane permeabilization-dependent necrosis pathway. *Toxicology Letter.*; 212: 268–275

Moncada S, Higgs EA.2006 The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol.* 2006 Jan;147 Suppl 1:S193-201.

Mudau M., Gens A., Locher A., Strijdom H., 2012. Endothelial dysfunction; the early predictor of atherosclerosis. *Cardiovas J.Afr.* 4: 222-231

Nagarajan S, Rajendran S, Saran U, Priya M. K, Swaminathan A, Siamwala J. H, Sinha S, Veeriah V, Sonar P, Jadhav V. et al., 2013. Nitric oxide protects endothelium from cadmium mediated leakiness. *Cell Biol. Int.* 37,495–506.

Nair A.R., DeGheselle O., Smeets K., Kerkhove E.V., A. 2013, Cadmium-Induced Pathologies: Where Is the Oxidative Balance Lost (or Not)?, *Int J Mol Sci.* (3): 6116–6143

NHLBI.NIH., 2016. What is Atherosclerosis? <https://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/atherosclerosis> downloaded on february, 20, 2017

Nimse S.B., Pal D. 2015. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv.*, 2015, 5, 27986-28006

Nordberg GF, Nogawa K, Nordberg M, Friedmann JM. 2007. Cadmium. In: Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg L, editors. *Handbook on the Toxicology of Metals*. Amsterdam: Elsevier; 445–486.

Osto E, Cosentino F., 2010. The role of oxidative stress in endothelial dysfunction and vascular inflammation. In: Ignarro LJ, editor. *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*. 2nd edn. London: Academic Press; pp. 705–754.

Padayatty S.J., Katz A., Wang Y., Eck P., Kwon O., Lee J.H., Chen S., Corpe C., Dutta A., Dutta S.K., Levine M., 2003. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention, *J Am Coll Nutr.* (1):1835

Park S, Han SS, Park CH, Hahm ER, Lee SJ, Park HK, Lee SH, Kim WS, Jung CW, Park K, et al. 2004. L-Ascorbic acid induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells via hydrogen peroxide-mediated mechanisms. *International Journal of Biochemistry. Cellular Biology.* 36:2180–2195. doi:10.1016/j.biocel. 2004.04.005

Pennathur, S. and Heinecke, J.W., 2007. Mechanisms for Oxidative Stress in Diabetic Cardiovascular Disease. *Antioxidants and Redox Signaling*, 9, 955-969.

Peters J.L., Perlstein T.S., Perry M.J., McNeely E., Weuve J., 2010. Cadmium exposure in association with history of stroke and heart failure, *Environ.Res.* 110(2)199 – 206

Rabelink T.J., de Boer H.C., van Zonneveld A.J., 2010. Endothelial activation and circulating markers of endothelial activation in kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 6: 404–414.

Ranugadevi J., Prabu S.M., 2010. Cadmium-induced hepatotoxicity in rats and the protective effect of naringenin, *Experimental and Toxicologic Pathology*. 62: 171–181

Roomi M.W., Shanker N., Niedzwiecki A., Rath M., Dr Rath Research Institute., 2015. Vitamin C in Health: Scientific focus on its anti-cancer efficacy. *Journal of Cellular Medicine and Natural Health*, 1- 16

Rubanyi GM. 1993. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J Cardiovasc Pharmacol.*, 22(Suppl):S1–S4.

Ruberg F.L., Loscalzo J., 2005. Inflammation and atherothrombosis. In: Loscalzo J, editor. *Molecular Mechanisms of Atherosclerosis*. London: Taylor and Francis; pp. 45–60

Sarbini D., Sargowo D., Rohman M.S. 2011. Hibiscus Sabdariffa Linn) terhadap NF- κ B, TNF- α dan ICAM-1 pada Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) Cultured yang dipapar Low Density Lipoprotein (LDL) Teroksidasi. *J Exp.Life.Sci.* 1(2)

Sena L.A., Li S., Jairaman A., Prakriya M., Ezponda T., Hildeman D. A., Wang C.R., Schumacker P.T., Licht J.D., Perlman H., Bryce P.J., Chandel N.S., 2013, Mitochondria are required for antigen-specific T cell activation through reactive oxygen species signaling, *Immunity*. 38(2):225-36

Sharma H., Rawal N., Mathew B.B., 2015. Cadmium: Toxicity effect and its mechanism. *Research Journal of Pharmacology and Toxicology* .01(01):1-5

Sharma P, Jha A.B., Dubey R.S., and Pessarakli M. 2012. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany* Volume 2012 (2012), Article ID 217037

Shiraishi N., Uno H., Waalkes M.P., 1993. Effect of L-Ascorbic Acid Pretreatment on Cadmium Toxicity in the Male Fischer (F344/NCr) Rat, *Toxicology* 85 (2-3), 85-10

Siddique YH, Ara G, Afzal M. 2012. Estimation of Lipid Peroxidation Induced by Hydrogen Peroxide in Cultured Human Lymphocytes, *Dose Response*. 10(1): 1- 10

Singh A., Neki N.S., Bisht M., Choudhry S., Sing I., Gupta H., 2012. Current Advances In Understanding The Pathogenesis Of Atherosclerosis In Clinical Implication In Coronary Artery Disease. *JIMSA*. 4: 251 – 253

Strijdom H, Chamane N, Lochner A. 2009. Nitric oxide in the cardiovascular system: a simple molecule with complex actions. *Cardiovasc J Afr* ;20(5):303-10.

Takgozoglul L., Kaya E.B., 2008. Atherosclerotic Vascular Disease and Risk factor in Turkey: From Past to Present *J.Atheroscler. Thromb.* 15: 286 - 291

Tellez-Plaza M., Guallar E., Howard B.V. et al., 2013. Cadmium exposure and incident cardiovascular disease, *Epidemiology*. 24(3):421-9. doi: 10.1097/EDE.0b013e31828b0631

Templeton DM, Liu Y. Multiple roles of cadmium in cell death and survival. *Chemico-Biological Interactions*. 2010; 188: 267–275.

Traber M.G., Stevens J.F., 2011. Vitamins C and E: Beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radic Biol Med*. 51(5):1000-13

U.S. Geological Survey, Mineral Commodity Summaries, U.S. Geological Survey, Rolla, MO, USA, 2012

UNEP.2010.United National Environment Program : Final Review of Scientific Information on Cadmium. www.unep.org/hazardoussubstances/Portals/9/Lead_Cadmium/docs/Interim_reviews/UNEP_GC26_INF_11_Add_2_Final_UNEP_Cadmium_review_and_appendix_Dec_2010.pdf, downloaded on Januari, 1, 2017

Valko M., Izakovic M., Mazur M., et al. 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Cell Biochem.* 266:37–56

Valko M., Rhodes C.J., Moncol J, et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biol Inter.* 160:1–40

Volinsky R., Kinnunen P. K. 2013. Oxidized phosphatidylcholines in membrane-level cellular signaling: from biophysics to physiology and molecular pathology. *FEBS J.* 280, 2806–2816.

Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D., 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology.* 192:95–117

Wang SH, Shih YL, Lee CC, Chen WL, Lin CJ, Lin YS, Wu KH, Shih CM. 2009. The role of endoplasmic reticulum in cadmium-induced mesangial cell apoptosis. *Chemico-Biological Interactions.* 181: 45–51

Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A .2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci* 9 244–252

Wang Y., Satoh A., Warren G., 2004. Mapping the functional domains of the Golgi stacking factor GRASP65. *JBC Papers.* 280(6):4921-8.

Wedepohl, K. H., 1995. The composition of the continental crust. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 59, 217-1232.

Weisberg M., Joseph P., Hele B., Beyerrmann D., 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology.* 192 (2 – 3): 95 – 117

WHO, 2010. Exposure to cadmium: A Mayor Public Health Concern, http://www.who.int/ipcs/assessment/public_health/cadmium/en/ downloaded on desember, 12, 2016

Yan H, Wang H, Zhang X, Li X, Yu J. 2015. Ascorbic acid ameliorates oxidative stress and inflammation in dextran sulfate sodium-induced ulceratif colitis in mice. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine.* 8(11):20245 – 20253

Yan M, Zhang Y, Xu K, Fu T, Qin H, Zheng X 2011. An in vitro study of vascular endothelial toxicity of CdTe quantum dots. *Toxicology*. 2011; 282: 94-103

Yang Z, Yang S, Qian SY, Hong JS, Kadiiska MB, Tennant RW, Waalkes MP, Liu J. 2007. Cadmium-induced toxicity in rat primary mid-brain neuroglia cultures: role of oxidative stress from microglia. *Toxicol Sci*.98:488–494.

Yang Z, Ming X.F.,2006. Recent advances in understanding endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Clin Med Res*. 4(1):53-65.

Yin H., Xu L., Porter N. A. 2011. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem. Rev.* 111, 5944–5972.

Yoshikawa T., Naito Y.,2002. "What is oxidative stress?" *Japan Medical Association Journal*, vol. 45, no. 7, pp. 271–276

Zalups R.K., Ahmad S.,2002. Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 186:163-188

Zalups RK, Ahmad S.2003. Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2003 Feb 1;186(3):163-88.

Zhang R., Brennan M.L., Fu X.,Aviles R.J., Pearce G.L., Penn M.S., Topol E.J., Spreacher D.L., Hazen S.L., 2001. Association Between Myeloperoxidase Level and Risk Coronary Artery Disease. *JAMA*. 286:pp 2136 – 2142

Zhao Y., Vanhoute P.M., Leung S.W.S.,2015. Vascular Nitric Oxide: Beyond eNOS. *Journal of Pharmacological Sciences* 129: 83 – 94Z

Zou M.H.,Cohen R.A., Shi C., 2002. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest*. 109(6): 817–826.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Keterangan Kelaikan Etik



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN

Jalan Veteran Malang - 65145, Jawa Timur - Indonesia
Telp. (62) (0341) 551611 Ext. 168; 569117; 567192 - Fax. (62) (0341) 564755
http://www.fk.ub.ac.id e-mail : kep.fk@ub.ac.id

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")

No. 133A / EC / KEPK – S2 / 04 / 2017

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA, SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN

- JUDUL** : Pengaruh Vitamin C terhadap Viabilitas Sel Endotel dan Disfungsi Endotel yang Dilihat Melalui NO dan MDA pada Kultur HUVECs yang Dipapar CdCl₂.
- PENELITI UTAMA** : dr. Kristianningrum Dian Sofiana
- UNIT / LEMBAGA** : S2 Biomedik – Fakultas Kedokteran – Universitas Brawijaya Malang.
- TEMPAT PENELITIAN** : Laboratorium Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

DINYATAKAN LAIK ETIK.

Malang, 06 APR 2017
Ketua
Komisi Etik Penelitian Kesehatan
Prof. Dr. dr. Moch. Istiadjid ES, SpS, SpBS (K), M.Hum
NIK: 160746683

Catatan :

Keterangan Laik Etik Ini Berlaku 1 (Satu) Tahun Sejak Tanggal Dikeluarkan Pada Akhir Penelitian, Laporan Pelaksanaan Penelitian Harus Diserahkan Kepada KEPK-FKUB Dalam Bentuk Soft Copy. Jika Ada Perubahan Protokol Dan / Atau Perpanjangan Penelitian, Harus Mengajukan Kembali Permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol)

Lampiran 2.

PENJELASAN UNTUK MENGIKUTI PENELITIAN

1. Saya, dr.Kristianningrum Dian Sofiana jurusan Magister Ilmu Biomedik FKUB, dengan ini meminta ibu untuk berpartisipasi dengan sukarela dalam penelitian yang berjudul “Pengaruh Vitamin C terhadap Viabilitas Sel Endotel dan Disfungsi Endotel Yang Dilihat Melalui NO dan MDA Pada Kultur HUVECs Yang Dipapar CdCl₂”
2. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui Pengaruh vitamin C dalam meningkatkan viabilitas sel, kadar NO (Nitrit Oxide) dan MDA pada kultur HUVECs (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) yang diinduksi CdCl₂. Penelitian ini dapat memberi manfaat dalam memberikan kontribusi ilmu pengetahuan di bidang biomedik dan bermanfaat menjadi dasar penelitian selanjutnya dalam hal pemanfaatan vitamin c sebagai antioksidan dengan cara sebagai penangkal radikal bebas (radikal scavenger) dengan meningkatkan kadar NO dan menghambat kadar MDA, serta hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai inovasi untuk menangkal toksisitas logam berat kadmium . Penelitian ini akan berlangsung selama kurang lebih 3 bulan, dengan sampel berupa umbilikus (tali pusar) bayi baru lahir yang akan diisolasi sel endotelnya dan dikultur kemudian diberikan perlakuan.
3. Pengambilan sampel yang berupa pemotongan akan tetap dilakukan oleh bidan/dokter kandungan yang bertugas pada saat proses persalinan. Kemudian setelah umbilikus dipisahkan, maka umbilikus akan dipotong sepanjang ±20-30 cm dan disimpan dalam wadah steril berisi *cord solution* yang sudah disiapkan oleh peneliti. Pengambilan ini tidak akan menyebabkan sesuatu pada ibu/bayi dikarenakan umbilikus adalah jaringan sisa kelahiran yang sudah berada diluar tubuh. Sehingga ibu tidak perlu kuatir dikarenakan pemotongan akan dilakukan di luar tubuh.

4. Keuntungan yang akan ibu peroleh dengan keikutsertaannya adalah kontribusi dalam mengembangkan ilmu pengetahuan di bidang ilmu biomedik dalam meneliti vitamin c sebagai terapi disfungsi endotel yang diakibatkan oleh intoksikasi logam berat kadmium. Ketidaknyaman/resiko yang mungkin akan muncul antara lain kontroversi dalam segi budaya yang menganjurkan untuk mengubur umbilikus (tali pusar) sisa kelahiran. Namun ibu tidak perlu khawatir dikarenakan plasenta dan sebagian umbilikus (tali pusar) yang tersisa akan tetap dapat dibawa pulang untuk dikuburkan karena yang diambil atau digunakan sebagai bahan penelitian hanyalah sebagian umbilikus (tali pusar) dengan panjang $\pm 20-30$ cm saja. Selain itu, ibu juga tidak perlu khawatir terkait sisa umbilikus setelah digunakan untuk penelitian, karena peneliti akan menguburkan dengan layak sesuai aturan penguburan yang etis terhadap sisa jaringan tubuh manusia.
5. Seandainya ibu tidak menyetujui cara ini, maka ibu dapat memilih cara lain atau boleh tidak mengikuti penelitian ini sama sekali.
6. Nama dan jati diri ibu akan tetap dirahasiakan.
7. Dalam penelitian ini ibu akan mendapatkan kompensasi berupa ucapan terimakasih dari peneliti dan parcel/bingkisan keperluan bayi sebagai tanda terimakasih telah bersedia memberikan sebagian umbilikus (tali pusar) bayi dalam pengembangan penelitian ini.

Peneliti

Pernyataan Persetujuan untuk Berpartisipasi dalam Penelitian

Saya yang bertanda tangan di bawah ini menyatakan bahwa:

1. Saya telah mengerti tentang apa yang tercantum dalam lembar penjelasan dan telah dijelaskan oleh peneliti.
2. Dengan ini saya menyatakan bahwa secara sukarela bersedia untuk ikut serta menjadi salah satu subjek penelitian yang berjudul "Pengaruh Vitamin C terhadap Viabilitas Sel Endotel dan Disfungsi Endotel Yang Dilihat Melalui NO dan MDA Pada Kultur HUVECs Yang Dipapar CdCl₂".

Peneliti,

(dr.Kristianningrum Dian Sofiana)
NIM. 15607010011100

Malang,,

Yang membuat pernyataan,

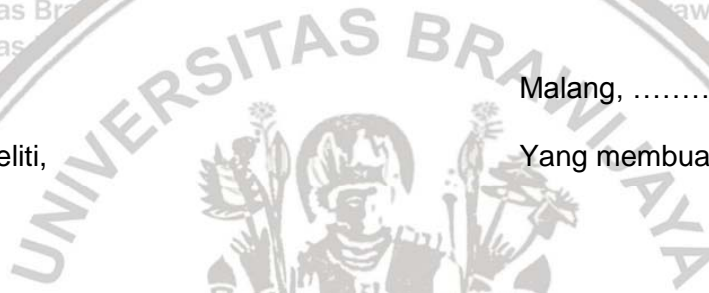
(.....)

Saksi I

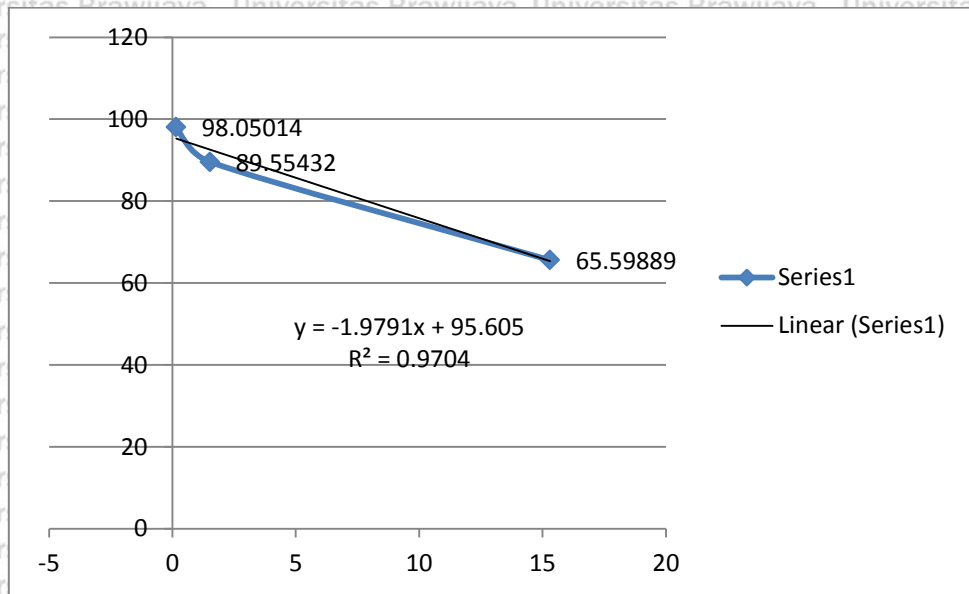
(.....)

Saksi II

(.....)



Lampiran 3. Perhitungan LD.50 CdCl₂



$$Y = -1,9791x + 95,605$$

$$X = \frac{95,605}{1,9791} = 48,307$$

$$LD.50 = \frac{1}{2} x = 24,154$$

$$LD\ 50\ CdCl_2 = 24,154\ \mu g/L$$



Lampiran 4

Hasil Uji Statistik Perbedaan Pengaruh Pemberian Kadmium terhadap Viabilitas Sel Endotel pada HUVECs yang Dipapar oleh CdCl₂

Asumsi Normalitas

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Standardized Residual for viabilitas_kadmium	,261	20	,001	,881	20	,018

a. Lilliefors Significance Correction

Asumsi Homogenitas

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: viabilitas_kadmium

F	df1	df2	Sig.
7,772	3	16	,002

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + perlakuan_kadmium

Kruskal Wallis

Test Statistics^{a,b}

	viabilitas_kadmium
Chi-Square	8,583
df	3
Asymp. Sig.	,035

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: perlakuan_kadmium

Uji Lanjutan Mann Whitney

Perbandingan K- dengan K0,153

Ranks

	perlakuan_kadmium	N	Mean Rank	Sum of Ranks
viabilitas_kadmium	K negatif	5	6,00	30,00
	K 0,153	5	5,00	25,00
	Total	10		

Test Statistics^a

	viabilitas_kadmium
Mann-Whitney U	10,000
Wilcoxon W	25,000
Z	-,557
Asymp. Sig. (2-tailed)	,577

Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,690 ^b
--------------------------------	-------------------

a. Grouping Variable: perlakuan_kadmium
 b. Not corrected for ties.

Perbandingan K- dengan K1,53

Ranks

	perlakuan_kadmium	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	K negatif	5	7,00	35,00
viabilitas_kadmium	K 1,53	5	4,00	20,00
	Total	10		

Test Statistics^a

	viabilitas_kadmium
Mann-Whitney U	5,000
Wilcoxon W	20,000
Z	-1,695
Asymp. Sig. (2-tailed)	,090
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,151 ^b

a. Grouping Variable: perlakuan_kadmium
 b. Not corrected for ties.

Perbandingan K- dan K15,3

Ranks

	perlakuan_kadmium	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	K negatif	5	8,00	40,00
viabilitas_kadmium	K 15,3	5	3,00	15,00
	Total	10		

Test Statistics^a

	viabilitas_kadmium
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	15,000
Z	-2,785
Asymp. Sig. (2-tailed)	,005
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,008 ^b

a. Grouping Variable: perlakuan_kadmium
 b. Not corrected for ties.

Perbandingan K0,153 dan K1,53

Ranks

	perlakuan_kadmium	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	K 0,153	5	6,40	32,00
viabilitas_kadmium	K 1,53	5	4,60	23,00
	Total	10		

Test Statistics^a

	viabilitas_kadmium
Mann-Whitney U	8,000
Wilcoxon W	23,000
Z	-,952
Asymp. Sig. (2-tailed)	,341
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,421 ^b

a. Grouping Variable: perlakuan_kadmium

b. Not corrected for ties.

Perbandingan K0,153 dan K15,3

Ranks

	perlakuan_kadmium	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	K 0,153	5	7,60	38,00
viabilitas_kadmium	K 15,3	5	3,40	17,00
	Total	10		

Test Statistics^a

	viabilitas_kadmium
Mann-Whitney U	2,000
Wilcoxon W	17,000
Z	-2,193
Asymp. Sig. (2-tailed)	,028
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,032 ^b

a. Grouping Variable: perlakuan_kadmium

b. Not corrected for ties.

Perbandingan K1,53 dan K15,3

Ranks

	perlakuan_kadmium	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	K 1,53	5	6,40	32,00
viabilitas_kadmium	K 15,3	5	4,60	23,00
	Total	10		

Test Statistics^a

	viabilitas_kadmium
Mann-Whitney U	8,000
Wilcoxon W	23,000
Z	-,952
Asymp. Sig. (2-tailed)	,341
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,421 ^b

a. Grouping Variable: perlakuan_kadmium

b. Not corrected for ties.



Lampiran 5. Hasil Uji Statistik Perbedaan Pengaruh Pemberian Vitamin C terhadap Viabilitas Sel Endotel pada HUVECs yang Dipapar oleh CdCl₂

Asumsi Normalitas

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Standardized Residual for viabilitas	,210	25	,006	,860	25	,003

a. Lilliefors Significance Correction

Asumsi Homogenitas

Levene's Test of Equality of Error

Variances^a

Dependent Variable: viabilitas

F	df1	df2	Sig.
2,924	4	20	,047

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + perlakuan

Kruskal Wallis

Test Statistics^{a,b}

	viabilitas
Chi-Square	13,474
Df	4
Asymp. Sig.	,009

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: perlakuan

Uji Lanjutan Mann Whitney

Descriptive Statistics

Dependent Variable: viabilitas

Perlakuan	Mean	Std. Deviation	N
kontrol positif	100,0000	,00000	5
kontrol negatif	66,1290	46,88530	5
vit C 50	135,4839	122,22465	5
vit C 100	195,1613	59,69921	5
vit C 200	148,3871	48,52132	5
Total	129,0323	76,42166	25

Perbandingan Kontrol Positif dan Kontrol Negatif

Test Statistics^a

	viabilitas
Mann-Whitney U	5,000
Wilcoxon W	20,000
Z	-1,671
Asymp. Sig. (2-tailed)	,095
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,151 ^b

a. Grouping Variable: perlakuan

b. Not corrected for ties.

Perbandingan Kontrol Positif dan Vitamin C 50 µM

Test Statistics^a

	viabilitas
Mann-Whitney U	10,000
Wilcoxon W	25,000
Z	-,557
Asymp. Sig. (2-tailed)	,577
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,690 ^b

a. Grouping Variable: perlakuan

b. Not corrected for ties.

Perbandingan Kontrol Positif dan Vitamin C 100 µM

Test Statistics^a

	viabilitas
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	15,000
Z	-2,785
Asymp. Sig. (2-tailed)	,005
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,008 ^b

a. Grouping Variable: perlakuan

b. Not corrected for ties.

Perbandingan Kontrol Positif dan Vitamin C 200 µM

Test Statistics^a

	viabilitas
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	15,000
Z	-2,785
Asymp. Sig. (2-tailed)	,005
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,008 ^b

a. Grouping Variable: perlakuan

b. Not corrected for ties.

Perbandingan Kontrol Negatif dan Vitamin C 50 µM

Test Statistics^a

	viabilitas
Mann-Whitney U	8,000
Wilcoxon W	23,000
Z	-,946
Asymp. Sig. (2-tailed)	,344
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,421 ^b

a. Grouping Variable: perlakuan

b. Not corrected for ties.

Perbandingan Kontrol Negatif dan Vitamin C 100 µM

Test Statistics^a

	viabilitas
Mann-Whitney U	1,000
Wilcoxon W	16,000
Z	-2,402
Asymp. Sig. (2-tailed)	,016
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,016 ^b

a. Grouping Variable: perlakuan

b. Not corrected for ties.

Perbandingan Kontrol Negatif dan Vitamin C 200 µM

Test Statistics^a

	viabilitas
Mann-Whitney U	1,500
Wilcoxon W	16,500
Z	-2,305
Asymp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,016 ^b

a. Grouping Variable: perlakuan

b. Not corrected for ties.

Perbandingan Vitamin C 50 µM dan Vitamin C 100 µM

Test Statistics^a

	viabilitas
Mann-Whitney U	5,000
Wilcoxon W	20,000
Z	-1,567
Asymp. Sig. (2-tailed)	,117
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,151 ^b

a. Grouping Variable: perlakuan

b. Not corrected for ties.

Perbandingan Vitamin C 50 µM dan Vitamin C 200 µM

Test Statistics^a

	viabilitas
Mann-Whitney U	5,000
Wilcoxon W	20,000
Z	-1,567
Asymp. Sig. (2-tailed)	,117
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,151 ^b

a. Grouping Variable: perlakuan

b. Not corrected for ties.

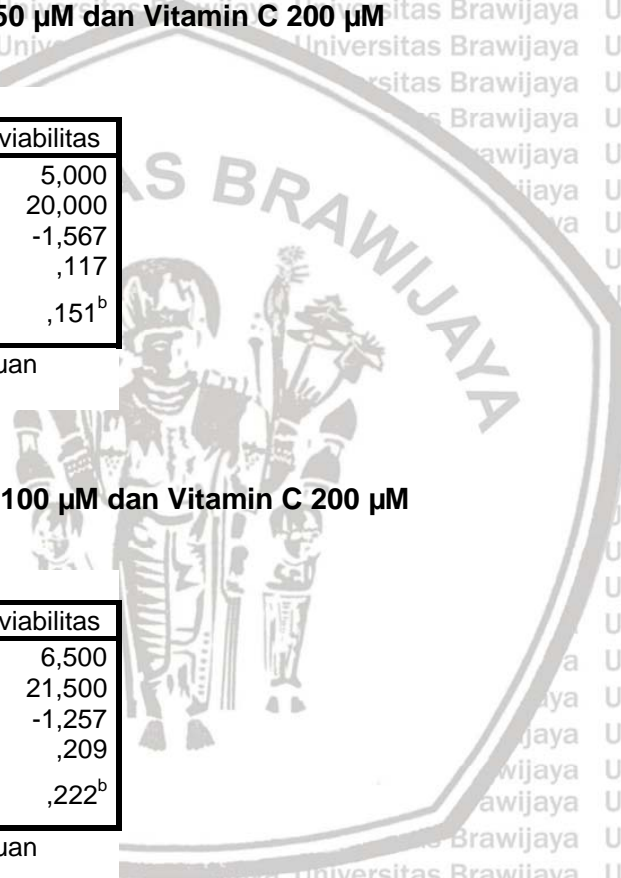
Perbandingan Vitamin C 100 µM dan Vitamin C 200 µM

Test Statistics^a

	viabilitas
Mann-Whitney U	6,500
Wilcoxon W	21,500
Z	-1,257
Asymp. Sig. (2-tailed)	,209
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,222 ^b

a. Grouping Variable: perlakuan

b. Not corrected for ties.



Lampiran 6. Perbedaan Pengaruh Pemberian Vitamin C terhadap Kadar NO pada HUVEC yang Dipapar oleh CdCl₂

Asumsi Normalitas

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Standardized Residual for NO	,136	25	,200*	,940	25	,149

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Asumsi Homogenitas

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: NO

F	df1	df2	Sig.
,566	4	20	,690

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + perlakuan

One Way ANOVA

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: NO

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	24,384 ^a	4	6,096	2,068	,123
Intercept	1305,016	1	1305,016	442,811	,000
Perlakuan	24,384	4	6,096	2,068	,123
Error	58,942	20	2,947		
Total	1388,342	25			
Corrected Total	83,326	24			

a. R Squared = ,293 (Adjusted R Squared = ,151)

Uji Lanjutan Tukey

Multiple Comparisons

Dependent Variable: NO

Tukey HSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol positif	kontrol negatif	2,9808	1,08575	,082	-,2682	6,2297
	vit C 50	,6923	1,08575	,967	-2,5567	3,9413
	vit C 100	1,1346	1,08575	,832	-2,1143	4,3836
	vit C 200	1,1346	1,08575	,832	-2,1143	4,3836
kontrol negatif	kontrol positif	-2,9808	1,08575	,082	-6,2297	,2682
	vit C 50	-2,2885	1,08575	,255	-5,5374	,9605
	vit C 100	-1,8462	1,08575	,456	-5,0951	1,4028
	vit C 200	-1,8462	1,08575	,456	-5,0951	1,4028
vit C 50	kontrol positif	-,6923	1,08575	,967	-3,9413	2,5567
	kontrol negatif	2,2885	1,08575	,255	-,9605	5,5374

vit C 100	vit C 100	,4423	1,08575	,994	-2,8067	3,6913
	vit C 200	,4423	1,08575	,994	-2,8067	3,6913
	kontrol positif	-1,1346	1,08575	,832	-4,3836	2,1143
	kontrol negatif	1,8462	1,08575	,456	-1,4028	5,0951
	vit C 50	-,4423	1,08575	,994	-3,6913	2,8067
vit C 200	vit C 200	,0000	1,08575	1,000	-3,2490	3,2490
	kontrol positif	-1,1346	1,08575	,832	-4,3836	2,1143
	kontrol negatif	1,8462	1,08575	,456	-1,4028	5,0951
	vit C 50	-,4423	1,08575	,994	-3,6913	2,8067
	vit C 100	,0000	1,08575	1,000	-3,2490	3,2490

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 2,947.

NO

Tukey HSD

Perlakuan	N	Subset
		1
kontrol negatif	5	5,4327
vit C 100	5	7,2788
vit C 200	5	7,2788
vit C 50	5	7,7212
kontrol positif	5	8,4135
Sig.		,082

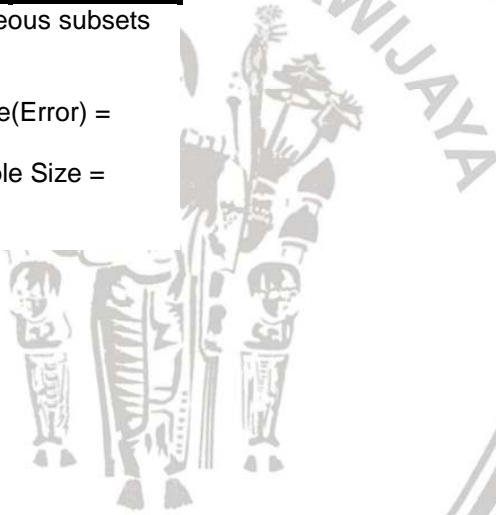
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 2,947.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

b. Alpha = 0,05.



Lampiran 7. Perbedaan Pengaruh Pemberian Vitamin C terhadap Kadar MDA pada HUVEC yang Dipapar oleh CdCl₂

Asumsi Normalitas

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Standardized Residual for MDA	,140	25	,200*	,968	25	,584

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Asumsi Homogenitas

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: MDA

F	df1	df2	Sig.
,850	4	20	,511

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + perlakuan

One Way ANOVA

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: MDA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,274 ^a	4	,069	1,872	,155
Intercept	2,962	1	2,962	80,833	,000
Perlakuan	,274	4	,069	1,872	,155
Error	,733	20	,037		
Total	3,969	25			
Corrected Total	1,007	24			

a. R Squared = ,272 (Adjusted R Squared = ,127)

Uji Lanjutan Tukey

Multiple Comparisons

Dependent Variable: MDA

Tukey HSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol positif	kontrol negatif	-,1062	,12107	,902	-,4685	,2561
	vit C 50	,0354	,12107	,998	-,3269	,3977
	vit C 100	,1196	,12107	,857	-,2426	,4819
	vit C 200	-,1770	,12107	,597	-,5393	,1853
kontrol negatif	kontrol positif	,1062	,12107	,902	-,2561	,4685
	vit C 50	,1416	,12107	,768	-,2207	,5039
	vit C 100	,2258	,12107	,367	-,1364	,5881
	vit C 200	-,0708	,12107	,976	-,4331	,2915

vit C 50	kontrol positif	-,0354	,12107	,998	-,3977	,3269
	kontrol negatif	-,1416	,12107	,768	-,5039	,2207
	vit C 100	,0842	,12107	,955	-,2780	,4465
	vit C 200	-,2124	,12107	,426	-,5747	,1499
vit C 100	kontrol positif	-,1196	,12107	,857	-,4819	,2426
	kontrol negatif	-,2258	,12107	,367	-,5881	,1364
	vit C 50	-,0842	,12107	,955	-,4465	,2780
	vit C 200	-,2966	,12107	,143	-,6589	,0656
vit C 200	kontrol positif	,1770	,12107	,597	-,1853	,5393
	kontrol negatif	,0708	,12107	,976	-,2915	,4331
	vit C 50	,2124	,12107	,426	-,1499	,5747
	vit C 100	,2966	,12107	,143	-,0656	,6589

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = ,037.

MDA

Tukey HSD

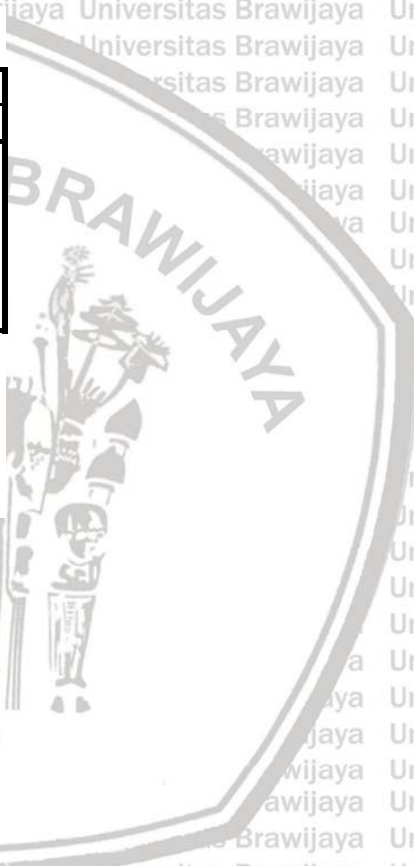
Perlakuan	N	Subset
		1
vit C 100	5	,1989
vit C 50	5	,2832
kontrol positif	5	,3186
kontrol negatif	5	,4248
vit C 200	5	,4956
Sig.		,143

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = ,037.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.
- b. Alpha = 0,05.



Lampiran 8. SURAT KETERANGAN BEBAS PLAGIASI



Jalan Veteran Malang – 65145, Jawa Timur - Indonesia
Telp. (0341) 551611 Pes. 213.214; 569117, 567192 – Fax. (62) (0341) 564755
http://www.fk.ub.ac.id e-mail : sekr.fk@ub.ac.id

SURAT KETERANGAN

Nomor : 013/UN10.F08.08/PN/2018

Berdasarkan pemindaian dengan perangkat lunak Turnitin, Badan Penerbitan Jurnal (BPJ) Fakultas Kedokteran menyatakan bahwa Artikel Ilmiah berikut :

- Judul : Pengaruh Vitamin Terhadap Viabilitas Sel Endotel dan Disfungsi Endotel Yang Melalui MDA Pada Kultur Sel Yang Dipapar CD 8
- Penulis : dr. Kristianningrum Dian Sofiana
- NIM : 156070100111003
- Jumlah Halaman : 65
- Jenis Artikel : Tesis (Program Studi Magister Ilmu Biomedik)
- Kemiripan : 4%

Demikian surat keterangan ini agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

11 0 JAN 2018

Ketua Badan Penerbitan Jurnal,



Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes
NIP 19751125 200501 2 001



Lampiran 9. Hasil Publikasi

Gapura UB

[Click here to enable desktop notifications for Universitas Brawijaya Mail.](#) [Learn more](#) [Hide](#)

Mail

COMPOSE Regarding submission of final version of article.

Inbox **anvpublications@anvpublication.org**
to Marswidodo1948, me

Starred

Sent Mail **Why is this message in Spam?** It's similar to messages that were detected by our spam filters. [Learn more](#)

Drafts (1)

More

KRISTIANNING

No recent chats
[Start a new one](#)

Dear Author(s),

Editorial board has considered your article titled **"The Effect of Vitamin C towards Endothelial Dysfunction in CdCl₂-induced HUVEC C** are requested to send the final version of your article by clearly mentioning the *Paper Title* and *Author(s) name, affiliation and email address*

Note:- Please submit the final version of article with in 7 Days.

Please Login to account from which you have submitted the article for more details. (To login now click : <http://www.anvpublication.org/Subs>)

Thank you.

Editor

ARTICLE SUBMISSION : A AND V PUBLICATIONS

Author(s) can submit their valuable manuscripts/ articles for enlisted journals of 'A and V Publications' through online submission menu. This is an online manuscript processing system, where you can submit articles and track their progress up to final published manuscript with a publication certificate. If you submit your articles online, there is no need to send a hard (printed) copy of the manuscript by post, courier or email. Before submitting your article, please read and follow the instructions to author (AuthorGuideline.aspx), that shall ensure rapid and efficient publication of your manuscript.

[SEARCH \(SUBSCRIBEDJOURNALSEARCH.ASPX\)](#) [DASHBOARD \(SUBSCRIBEDUSER_HOME.ASPX\)](#) [PAPER SUBMISSION](#) [SUBSCRIPTION](#)
[BOOKS](#) [BOOK ADVERTISEMENT \(ADVERTISEMENT_SUBSCRIPTION.ASPX\)](#) [MY CART \(0\)](#) [MY ORDERS \(MY_ORDERS.ASPX\)](#)

[Submit A New Article](#) [Alternate Link](#)

You have already submitted following articles :

Article Details	Charges	Status & Actions
<p>s://www.facebook.com/anvpublication</p> <p>Paper ID: 171110091046670491</p> <p>Title: The Effect of Vitamin C towards Endothelial Dysfunction in CdCl₂-induced HUVEC Culture</p> <p>Authors: Kristianningrum Dian Sofiana; Bunga Prihardina; Husnul Khotima; M. Aris Widodo (kdsfiana.fk@student.ub.ac.id; bunga.fk@ub.ac.id; Marswidodo1948@yahoo.com)</p> <p>Submitted To: Research Journal of Pharmacy and Technology (to:anvpublications@gmail.com)</p> <p>Payment Transaction No. : 1765-7545-6036-0492</p> <p>Paid On : 1/9/2018 12:00:00 AM</p>	<p>INR: 2000.00</p> <p>Or USD: 118.00</p>	<p>PAYMENT VERIFIED (14-Jan-2018)</p> <p>Editorial Comments</p> <p>Reviewer Comments (ViewReviewComments.aspx?tmppid=171110091046670491)</p> <p>Download Acceptance Letter</p> <p>Print Report</p>

LAMPIRAN 10. Riwayat Hidup

Kristianningrum Dian Sofiana, lahir di Malang 6 September 1986, putri dari Bapak Jilan SH dan Ibu Sukemi SST.SH.MMKes. Lulus SDN Dinoyo 6 tahun 1998, lulus SLTP Negeri 3 Malang tahun 2001 dan lulus SMU Negeri 3 Malang tahun 2004. Tahun 2005 melanjutkan pendidikan pada jenjang S1 di Fakultas Kedokteran Universitas Sam Ratulangi Manado, lulus tahun 2009. Tahun 2009 melanjutkan pendidikan profesi dokter di universitas yang sama, dan lulus pada awal tahun 2011. Pada tahun 2015 mengambil Program Magister Biomedik di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Tahun 2013 sampai sekarang bekerja sebagai dosen Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Menikah dengan Mokhammad Bahrul Huda SH.MH dan dikaruniai seorang putra.



Malang, 16 Januari 2018



