

PEMBERIAN EKSTRAK BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L.) MENURUNKAN KADAR MALONDIALDEHIDE DAN MENINGKATKAN KADAR NO_x DARAH TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI STRES PSIKOSOSIAL

Dewi Wiryanthini IA¹, Aman IGM², Bagiada NA¹

Bagian Biokimia¹ dan Bagian Farmakologi²
Fakultas Kedokteran Universitas Udayana

ABSTRAK

Peningkatan produksi *reactive oxygen species* (ROS) menyebabkan akumulasi kerusakan oksidatif akibat jumlah radikal bebas meningkat melebihi jumlah antioksidan dalam tubuh. Stres psikologis berupa stres psikososial dapat menyebabkan terjadinya stres oksidatif, menyebabkan peningkatan kadar Malondialdehide (MDA) dan menurunkan kadar nitrat dan nitrit (NO_x) darah sebagai metabolit antara *nitric oxide* (NO). Ekstrak biji kakao mengandung antioksidan *flavanols* yang terdiri dari *catechin*, *epicatechin* dan *procyanidin*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh ekstrak biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dalam menurunkan kadar MDA dan meningkatkan kadar NO_x darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) pada kondisi stres oksidatif yang diinduksi stres psikososial. Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental *Pretest-Posttest Control Group Design*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa setelah pemberian ekstrak biji kakao terjadi penurunan kadar MDA darah tikus putih akibat stres oksidatif yang diinduksi stres psikososial pada kelompok P1 (11,74 vs 8,04), P2 (11,92 vs 5,44) dan P3 (11,69 vs 2,87) dengan nilai P = 0,000 serta peningkatan kadar NO_x pada kelompok P1 (1909,83 vs 2085,16), P2 (1912,5 vs 2231,83) dan P3 (1871,5 vs 2339,83) dengan nilai P = 0,005. Penelitian ini menyimpulkan bahwa ekstrak biji kakao dapat menghambat stres oksidatif yang diakibatkan oleh stres psikososial. [*MEDICINA*. 2012;43:146-52].

Kata kunci: stres psikososial, stres oksidatif, ekstrak biji kakao, MDA, NO_x

ADMINISTRATION OF CACAO BEANS (*Theobroma cacao* L.) EXTRACTS DECREASE MALONDIALDEHYDE CONCENTRATION AND INCREASE BLOOD NO_x CONCENTRATION IN WHITE RAT (*Rattus norvegicus*) INDUCED BY PSYCHOSOCIAL STRESS

Dewi Wiryanthini IA¹, Aman IGM², Bagiada NA¹

Department of Biochemistry¹ and Pharmacology²
Medical School Udayana University Denpasar

ABSTRACT

Increased production of reactive oxygen species (ROS) causing accumulation of oxidative damage caused by exceeding anti oxidant capacity in the body. Psychological stress as psychosocial stress can induce oxidative stress which subsequently cause increase blood malondialdehyde (MDA) and decrease blood nitrate and nitrite (NO_x) concentration as intermediate product of nitric oxide (NO). Cacao beans extracts contained anti oxidant *flavanols* consist of *catechin*, *epicatechin* and *procyanidin*. The aims of this study is to investigate the effect of cacao beans (*Theobroma cacao* L.) extracts for decreasing MDA and increasing NO_x concentration in white rat (*Rattus norvegicus*) blood in stress oxidative state induced by psychosocial stress. It is an experimental study with *Pretest-Posttest Control Group Design*. This study revealed decrease MDA concentration in group P1 (11.47 vs 8.04), P2 (11.92 vs 5.44) and P3 (11.69 vs 2.87) with P = 0.000 and increase NO_x concentration in oxidative stress white rat induced by psychosocial stress after administration of cacao beans extract in group P1 (1909.83 vs 2085.16), P2 (1912.5 vs 2231.83) and P3 (1871.5 vs 2339.83) with P = 0.005. This study showed that cacao beans extract can inhibit oxidative stress caused by psychosocial stress. [*MEDICINA*. 2012;43:146-52].

Keywords: Psychosocial stress, oxidative stress, cacao beans extract, MDA, NO_x

PENDAHULUAN

Penuaan merupakan salah satu tahapan proses yang dialami oleh semua makhluk hidup, mengakibatkan penurunan berbagai sistem dan fungsi tubuh menyebabkan munculnya penyakit. Penyebab penuaan dikelompokkan menjadi faktor internal dan eksternal.¹ Salah satu faktor internal penyebab penuaan adalah radikal bebas. Kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas sering dihubungkan dengan sejumlah penyakit degeneratif baik penyakit jantung koroner maupun aterosklerosis dan kanker.² Faktor eksternal sebagai penyebab penuaan adalah stres. Produksi radikal bebas meningkat pada keadaan patologis akibat stres fisik maupun psikologis.³ Suatu kondisi dimana jumlah anti oksidan lebih rendah dibandingkan radikal bebas disebut stres oksidatif.⁴

Radikal bebas menyebabkan peroksidasi lipid, proses dimana radikal bebas mengambil elektron pada lipid membran sel yang menyebabkan terjadinya kerusakan sel. Produk yang dihasilkan akibat peroksidasi lipid seperti malondialdehyde (MDA), 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), 4-hydroxy-2-hexenal (4-HHE).⁵ MDA adalah senyawa dialdehid, merupakan produk akhir peroksidasi lipid di dalam tubuh.⁶

Nitric oxide merupakan endothelium-derived relaxing factor (EDRF), untuk relaksasi otot polos pembuluh darah, berfungsi sebagai vasodilator dan meningkatkan aliran

darah.⁷ Di dalam jaringan, NO dibentuk oleh L-arginine oleh enzim endothelial nitric oxide synthase (eNOS) dengan kofaktor NADPH, oksigen (O₂), dan tetrahydrobiopterin (BH4) menghasilkan L-citrulline serta nitrat dan nitrit sebagai metabolit antara.^{8,9} NO yang tidak digunakan dioksidasi menjadi nitrit, apabila NO diperlukankembali, nitrit dalam jaringan direduksi menjadi NO dikatalisis oleh enzim xanthine oxidase (XO). Kadar nitrat dan nitrit (NO_x) relatif stabil di dalam darah, sehingga dipakai sebagai indikator sintesis NO tubuh.⁹

Stres oksidatif merupakan pemicu aktivasi disfungsi endotel ditandai dengan penurunan kadar NO. Endotel mempunyai banyak fungsi penting antara lain mengatur tekanan darah melalui pelepasan bahan vasokonstriktor dan vasodilator, mengatur fungsi antikoagulan, antiplatelet dan fibrinolisis.⁴ Beberapa mekanisme yang mungkin terjadi pada stres oksidatif menyebabkan disfungsi endotel yaitu menurunnya vasodilator NO akibat ROS, terbentuknya produk peroksidasi lipid yang berperan sebagai vasokonstriktor, berkurangnya BH4 yang merupakan kofaktor penting untuk sintesa NO, menyebabkan kerusakan sel endotel serta kerusakan pada sel otot polos pembuluh darah, peningkatan konsentrasi kalsium bebas dalam sel dan peningkatan permeabilitas endotel.¹⁰

Biji kakao (*Theobroma cacao* L.) atau cokelat kaya kandungan antioksidan

flavonoid, berupa monomer flavan-3-ol (flavanols) meliputi epicatechin dan catechin, serta oligomer flavanols yaitu procyanidin. Konsumsi makanan yang kaya kandungan flavonoidnya telah terbukti memiliki manfaat untuk kesehatan jantung dan pembuluh darah.¹¹ Manfaat biji kakao telah banyak diteliti, namun khasiatnya dalam mengatasi keadaan stres oksidatif yang diakibatkan oleh stres psikososial masih perlu dilakukan penelitian lebih lanjut, terutama biji kakao yang bersumber dari daerah Bali. Oleh karena itu penelitian ini ingin mengetahui pengaruh pemberian ekstrak biji kakao (*Theobroma cacao* L.), khususnya yang bersumber dari daerah Bali untuk menurunkan kadar MDA dan meningkatkan kadar NO_x darah tikus pada kondisi stres oksidatif yang diinduksi stres psikososial.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni dengan desain pre and post test control group design. Subjek penelitian adalah tikus putih jantan galur Wistar yang berumur 4 bulan dengan berat badan 180-200 gram yang diperoleh dari Animal Laboratory Unit (ALU) Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana dan diberikan perlakuan stres psikososial selama 14 hari. Sebanyak 24 ekor tikus yang telah mengalami stres oksidatif setelah perlakuan stres psikososial dibagi menjadi 4 kelompok dan setiap kelompok terdiri atas 6 ekor

tikus. Kelompok P0 adalah kontrol diberikan aquabides selama 14 hari, kelompok P1 diberikan ekstrak biji kakao 70 mg per ekor per hari selama 14 hari, kelompok P2 diberikan ekstrak biji kakao 140 mg per ekor per hari selama 14 hari dan kelompok P3 diberikan ekstrak biji kakao 280 mg per ekor per hari selama 14 hari. Darah diambil dari semua tikus melalui medial canthus sinus orbitalis untuk pemeriksaan kadar MDA dan NOx.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak biji kakao dibuat dari biji kakao kering yang telah dikupas kulit bijinya. Biji kakao diblender sampai halus, 500 gram bubuk kakao kemudian dimaserasi menggunakan etanol 96% selama 48 jam, lalu diuapkan menggunakan evaporator sehingga dihasilkan 75 gram ekstrak biji kakao dan siap digunakan untuk penelitian.

Alat yang digunakan, yaitu : (1) kandang ukuran 20x10x12cm untuk memberikan stres psikososial, (2) kandang pemeliharaan ukuran 50x40x15 cm, (3) sonde untuk memberikan ekstrak biji kakao dan aquabides peroral, (4) timbangan digital, (5) sentrifus, (6) spektrofotometer, (7) ELISA reader, dan (8) pipa kapiler.

Cara Penelitian

Hewan coba tikus sebanyak 24 ekor diadaptasikan selama 7 hari. Tikus yang telah diadaptasikan diukur rerata kadar MDA awal diperoleh kadar 1,96 mmol/L dan NOx awal diperoleh kadar 2064 nmol/L. Tikus-tikus kemudian dibuat stres oksidatif dengan perlakuan stres psikososial dengan cara menempatkan 5 ekor tikus pada satu kandang dengan ukuran 20 x 10 x 12 cm selama 4 jam/hari selama 14 hari.¹² Pada hari ke-15 diukur kadar MDA dan NOx sebagai data pretest. Rerata kadar MDA setelah pemberian stres psikososial pada penelitian ini adalah 11,68 mmol/L meningkat 5,9 kali dibandingkan kadar MDA awal dan kadar NOx adalah 1910,29 nmol/L menurun 1,08 kali dibandingkan kadar NOx awal. Tikus kemudian diacak sederhana dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu P0, P1, P2, dan P3. Tiap kelompok berjumlah 6 ekor tikus. Kelompok P0 diberi perlakuan berupa aquabides, kelompok P1, P2, dan P3 diberikan Ekstrak Biji Kakao (1,5 mL) dengan dosis 70mg/200 gram berat badan tikus (P1), 140 mg/200 gram berat badan tikus (P2) dan 280 mg/200 gram berat badan tikus (P3) selama 14 hari. Pada tahap ini stres psikososial tetap dilakukan.

Hari ke-29 semua tikus diukur kadar MDA dan NOx darah sebagai posttest.

Pemeriksaan Kadar MDA dan NOx

Sampel penelitian dipuasakan selama 10-12 jam, pada pagi hari dilakukan pengambilan darah dengan pipet kapiler sebanyak 2 mL. Selanjutnya darah ditampung dalam vacutainer, disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit, dan didapatkan sebanyak 1 mL plasma selanjutnya dimasukkan dalam tabung untuk segera diperiksa.

Pengukuran kadar MDA dilakukan di Pusat Studi Pangan dan Gizi Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada menggunakan metode TBARSC yaitu mengukur konsentrasi Thiobarbituric Acid Reactive Substances menggunakan spektrofotometer panjang gelombang 532 nm, dengan satuan mmol/L.

Pemeriksaan kadar NOx plasma dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Udayana menggunakan kit pemeriksaan Colorimetric Griess dan pembacaan absorbance 520-560 nm menggunakan Elisa reader.¹³

Tabel 1. Kadar MDA dan NOx plasma pada kelompok kontrol dan kelompok yang mendapat ekstrak biji kakao dengan tiga variasi dosis

Variabel	P0 (n=6)	P1 (n=6)	P2 (n=6)	P3 (n=6)
MDA hari ke-14	11,37(SB0,28)	11,74(SB0,36)	11,92(SB0,38)	11,69(SB0,28)
MDA hari ke-29	13,47(SB0,20)	8,04(SB0,23)	5,44(SB0,14)	2,87(SB0,21)
NOx hari ke-14	1947,33(SB190,44)	1909,83(SB336,94)	1912,50(SB318,01)	1871,50(SB328,64)
NOx hari ke-29	1861,00(SB240,01)	2085,16(SB267,14)	2231,83(SB189,84)	2339,83(SB122,06)

Analisis Data

Data yang diperoleh pada penelitian ini dianalisis dengan uji One Way Anova untuk mengetahui perbedaan antar kelompok, dengan derajat signifikansi ditetapkan dengan nilai $P < 0,05$. Bila uji One Way Anova menunjukkan perbedaan yang bermakna maka dilanjutkan dengan Post Hoc test untuk mengetahui derajat perbedaan antar kelompok, dengan derajat signifikansi $P < 0,05$.

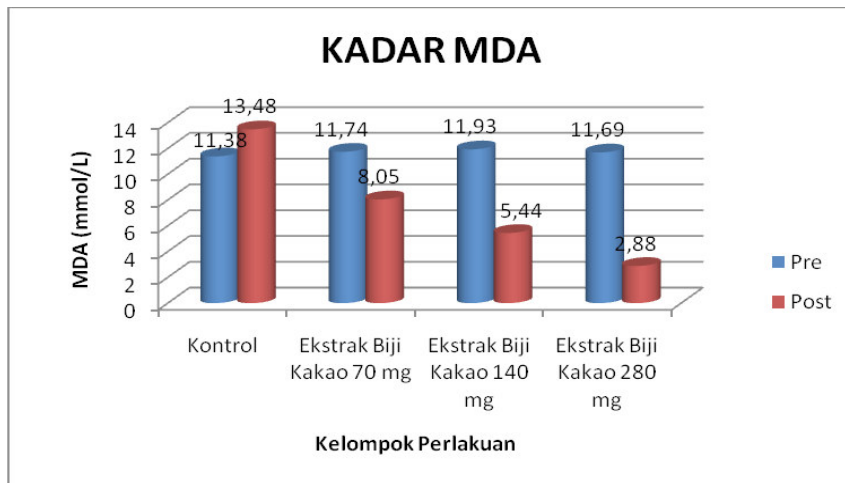
HASIL

Keadaan stres oksidatif dicapai setelah 14 hari pemberian stres psikososial dengan peningkatan kadar MDA 5,9 kali dan penurunan kadar NOx 1,08 kali dibandingkan kadar awal, dimana rerata kadar MDA darah awal yaitu 1,96 mmol/L dan NOx 2064 nmol/L sedangkan rerata kadar MDA darah setelah pemberian stres psikososial adalah 11,68 mmol/L dan NOx 1910,29 nmol/L. Pada Tabel 1 terlihat adanya peningkatan rerata kadar MDA dan penurunan rerata kadar NOx darah setelah pemberian

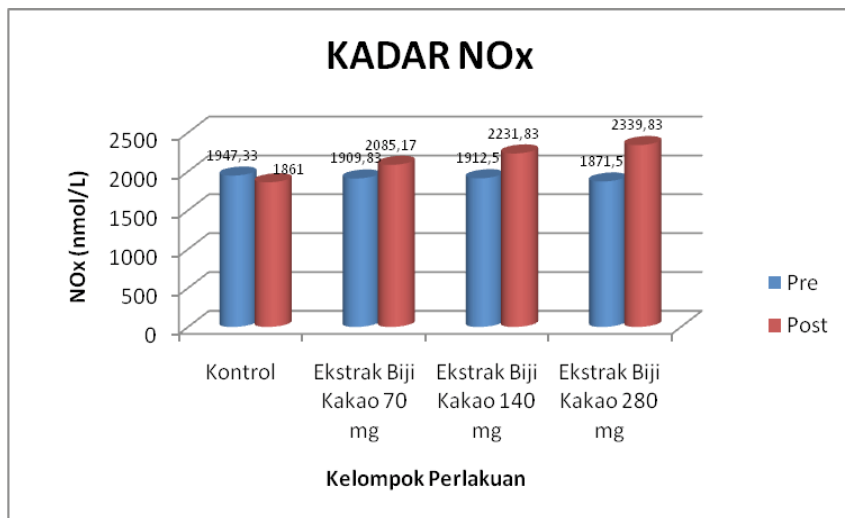
14 hari stres psikososial pada kelompok P0, sedangkan pada kelompok P1, P2 dan P3 terlihat penurunan rerata kadar MDA dan peningkatan rerata kadar NOx darah setelah pemberian 14 hari stres psikososial dan ekstrak biji kakao.

Pada Gambar 1 dapat dilihat adanya perbedaan kadar MDA plasma antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan setelah pemberian stres, sedangkan sebelum pemberian stres kadar MDA hanya sedikit berbeda. Analisis One-way Anova hari ke-14 tidak mendapatkan adanya perbedaan yang bermakna, sedangkan pada hari ke-29 terdapat perbedaan yang bermakna ($P < 0,05$). Analisis dengan post hoc test mendapatkan adanya perbedaan yang bermakna kadar MDA pada hari ke-29 antara kelompok P0 dengan P1, P2 dan P3, antara kelompok P1 dengan P2 dan P3 dan antara kelompok P2 dengan P3.

Pada Gambar 2 dapat dilihat adanya perbedaan kadar NOx plasma antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan setelah pemberian stres, sedangkan sebelum pemberian stres kadar NOx hanya sedikit berbeda. Analisis One-way Anova hari ke-14 tidak mendapatkan adanya perbedaan yang bermakna, sedangkan pada hari ke-29 terdapat perbedaan yang bermakna ($P < 0,05$). Analisis dengan post hoc test mendapatkan adanya perbedaan yang bermakna kadar NOx pada hari ke-29 antara kelompok P0 dengan P2 dan P3.



Gambar 1. Kadar MDA sebelum dan setelah pemberian ekstrak biji kakao dengan tiga variasi dosis.



Gambar 2. Kadar NOx sebelum dan setelah pemberian ekstrak biji kakao dengan tiga variasi dosis.

Dari hasil penelitian ini dapat dilihat bahwa pemberian ekstrak biji kakao dapat menurunkan kadar MDA dan meningkatkan kadar NOx pada tikus yang mengalami stres oksidatif akibat stres psikososial.

DISKUSI

Stres adalah reaksi atau respon tubuh terhadap stresor psikososial (tekanan mental/ beban kehidupan), berupa respon fisiologis, perilaku dan subjektif terhadap stres. Hubungan antara faktor psikik berupa stres psikologis dengan kejadian sakit merupakan topik yang sangat penting sejak teori stres muncul. Telah diketahui dengan baik bahwa penyakit pada sirkulasi darah dan ulkus pada saluran pencernaan berhubungan erat dengan kejadian stres. Mekanisme pasti bagaimana stres psikososial menimbulkan peningkatan pembentukan radikal bebas masih belum jelas. Kortisol dan norepinefrin yang dilepaskan sebagai respon terhadap stres psikososial akan menyebabkan peningkatan glukoneogenesis dan glikogenolisis yang menyebabkan kadar glukosa darah meningkat. Glukosa darah yang meningkat secara akut ataupun kronis akan menimbulkan terjadinya stres oksidatif.¹⁴ Hiperglikemia menyebabkan kerusakan sel akibat penumpukan ROS intraseluler, melalui mekanisme glikasi non-enzimatik pada protein menghasilkan AGEs, pembentukan sorbitol melalui jalur poliol-sorbitol (aldosa reduktase), autooksidasi glukosa mengakibatkan

peningkatan radikal superoksida dan kerusakan enzim SOD serta pengaktifan Protein Kinase C.¹⁵

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terjadi kenaikan kadar MDA darah tikus 5,9 kali setelah pemberian stres psikososial selama 14 hari dibandingkan kadar awal MDA darah tikus. Pemberian ekstrak biji kakao selama 14 hari dapat menurunkan kadar MDA darah tikus yang mengalami stres oksidatif setelah diinduksi oleh stres psikososial. Penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Rein dkk (2000)¹⁶ bahwa terjadi penurunan kadar MDA dan peningkatan kadar total antioksidan plasma 2 jam setelah konsumsi kakao yang mengandung 80 gram flavonoid.

Penelitian sebelumnya diketahui bahwa pemberian stres psikososial dengan menempatkan 5 ekor tikus dewasa dalam satu kandang seluas 200 cm² selama 6 minggu menunjukkan terjadinya peningkatan tekanan darah, menurunnya konsentrasi NO di aorta¹⁷, dan terjadi cedera subseluler di sel endotel aorta yang ditandai dengan kerusakan mitokondria, peningkatan jumlah lisosom, perubahan intercelluler connection, dan disrupsi endotel.¹⁸ Pemberian stres isolasi pada 2 kelompok mencit, selama 7 hari dan 30 hari perlakuan stres isolasi menyebabkan peningkatan kadar corticosterone dan menimbulkan stres oksidatif pada DNA sel darah perifer.¹⁹ Penelitian pemberian bubuk kakao yang mengandung 897 mg flavanols setelah enam jam memiliki efek yang sama

dengan pemberian bubuk kakao yang mengandung 234 mg flavanols selama 4 minggu, yaitu sama-sama menghambat aktivasi dan fungsi platelet sehingga dapat mencegah terjadinya plak aterosklerosis.²⁰

Peningkatan stres oksidatif sebanding dengan penurunan mekanisme antioksidan serta peningkatan akumulasi produk ROS yang menyebabkan disfungsi endotel.²¹ Stres oksidatif akibat stres psikososial merupakan pemicu aktivasi disfungsi endotel, yang ditandai dengan penurunan kadar NO.⁴

Gugus fitokimia dari berbagai tumbuh-tumbuhan telah banyak diteliti dan diyakini dapat melindungi sel dari pengaruh stres oksidatif.²² Terdapat bukti bahwa antioksidan yang terdapat pada biji kakao memiliki efek yang baik untuk kesehatan. Biji kakao memiliki kandungan flavanols (catechin, epicatechin dan procyanidin) tinggi yang terbukti memiliki manfaat untuk kesehatan jantung dan pembuluh darah.¹¹ Biji kakao yang memiliki manfaat terhadap kesehatan terdapat dalam bentuk bubuk kakao maupun ekstrak biji kakao. Mekanisme kerja flavanols yang terdapat pada biji kakao untuk mengatasi stres oksidatif yaitu mengurangi pembentukan radikal bebas dengan memakan atau menangkap radikal bebas secara langsung (free radical scavenger), meregenerasi α - tokoferol dan antioksidan lainnya dengan mendonorkan atom hidrogen kepada radikal α -tokoferol dan dapat berperan sebagai chelating agent serta mengikat logam

redoks aktif termasuk Fe²⁺ dan Cu²⁺ yang terlibat pada pembentukan radikal bebas.²³ Manfaat flavanols yang dapat mengatasi stres oksidatif, mengakibatkan penurunan kadar radikal bebas, sehingga bioavailabilitas NO dapat dipertahankan.⁹ Mekanisme kerja flavanols mencegah penurunan NOx yaitu dengan meningkatkan aktivitas eNOS dan mengurangi pembentukan radikal peroksinitrit.²⁴

Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa pemberian ekstrak biji kakao dosis 280 mg/200 gram berat badan tikus yang mengalami stres oksidatif akibat stres psikososial selama 14 hari dapat secara efektif menurunkan kadar MDA dan meningkatkan kadar NOx plasma. Hasil penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian Murphy et al. (2001), pemberian bubuk kakao yang mengandung 234 mg flavanols selama 4 minggu, yaitu memiliki efek menghambat aktivasi dan fungsi platelet sehingga dapat mencegah terjadinya plak aterosklerosis.²⁰ Pada penelitian ini didapatkan hasil yaitu : kelompok yang mendapat ekstrak biji kakao (P1, P2 dan P3) mempunyai rata-rata kadar MDA plasma lebih rendah dan kadar NOx plasma lebih tinggi bila dibandingkan dengan kontrol. Kadar MDA menurun dan kadar NOx meningkat sesuai dengan peningkatan dosis ekstrak biji kakao, terlihat dari hasil penelitian ini yaitu kadar MDA plasma terendah dan kadar NOx plasma tertinggi pada dosis ekstrak biji kakao 280 mg/200 gram berat badan tikus.

Penurunan kadar MDA dan peningkatan kadar NOx disebabkan oleh kemampuan flavanols pada biji kakao untuk mengatasi disfungsi endotel dengan mencegah peningkatan kadar MDA serta penurunan kadar NOx yaitu dengan mencegah pembentukan peroksidasi lipid yang berperan sebagai vasokonstriktor, mencegah penurunan BH4 sehingga meningkatkan aktivitas eNOS dan mengurangi pembentukan radikal peroksinitrit.^{10,24} Pemberian antioksidan flavanols telah terbukti dapat menurunkan produk stres oksidatif sehingga dapat mencegah disfungsi endotel.

SIMPULAN

Ekstrak biji kakao dapat menurunkan kadar MDA dan meningkatkan kadar NOx plasma pada tikus yang mengalami stres oksidatif akibat stres psikososial.

DAFTAR PUSTAKA

1. Pangkahila W. Anti-Aging Medicine : Memperlambat Penuaan Meningkatkan Kualitas Hidup. Jakarta: Kompas; 2007.
2. Eibond LA, Reynertson KA, Luo XD, Basile MJ, Kennelly EJ. Anthocyanin antioxidants from Edible fruits. Food Chemistry. 2004;84:23-8.
3. Lei W, Gong M, Nishida H, Shirakawa C, Sato S, Konishi T. Psychological Stress-Induced Oxidative Stress as a Model of Sub-Healthy Condition and the Effect of TCM. Evid Based

- Complement Alternat Med. 2007;4(2):195-202.
4. Granger JP, Alexander BT, Llinas MT, Bennet WA, Khalil RA. Pathophysiology of Hypertension During Preeclampsia Linking Placental Ischemia With Endothelial Dysfunction. Hypertension. 2001;38(2):718-22.
5. Catala A. Lipid Peroxidation. Int J Biochem Cell Biol. 2006;38:1482-95.
6. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Ilzani A. Biomarker of Oxidative Damage in Human Disease. Clinical Chemistry. 2006;52(4):601-23.
7. Ceriello A. Possible Role of Oxidative Stress in The Pathogenesis of Hypertension. Diabetes Care. 2008;31(2):S181.
8. R&D Systems. Nitric Oxide Synthases. 2000 [diakses 3 Juni 2011]; Diunduh dari : http://rndsystems.com/mini_review_detail_objectname_MR00_NOS.aspx.
9. Lundberg JO, Weitzberg E. NO Generation From Nitrite and Its Role in Vascular Control. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005;25:915-22.
10. Grossman E. Does Increased Oxidative Stress Cause Hypertension? Diabetes Care. 2008;31(2):S185.
11. Mao TK, Van De Water J, Keen CL, Schitz HH, Gershwin ME. Cocoa Flavanols and Procyanidins Promote Transforming Growth Factor-β₁

- Homeostasis in Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Exp Biol Med.* 2003;228:93-9.
12. Wardana ING. Pemberian Testosteron Meningkatkan Jumlah Sel Otot Polos Korpus Kavemosum Tikus yang dalam Kondisi Stres Oksidatif [tesis]. Program Magister Ilmu Biomedik Universitas Udayana, 2010.
 13. Tarpey MM, Fridovich I. Method of Detection of Vascular Reactive Species : Nitric Oxide, Superoxide, Hydrogen Peroxide, and Peroxynitrite. *Circ Res.* 2001;89:224-36.
 14. Vinna J, Gimeno A, Sastre J, Desco C, Asensio M, Pallardo FV, dkk. Mechanism of Free Radical Production in Exhaustive Exercise in Humans and Rats; Role of Xanthine Oxidase and Protection by Allopurinol. *Informa Healthcare.* 2000;49(6):539-44.
 15. Setiawan B, Suhartono E. Stres Oksidatif dan Peran Antioksidan pada Diabetes Melitus. *Majalah Kedokteran Indonesia.* 2005;55(2):86-91.
 16. Rein D, Lotito S, Holt RR, Keen CL, Schmitz HH, Fraga CG. Epicatechin in Human Plasma : In Vivo Determination and Effect of Chocolate Consumption on Plasma Oxidation Status. *J Nutr.* 2000;2109S-14S.
 17. Bernatova I, Csizmadiova Z. Effect of Chronic Social Stress on Nitric Oxide Synthesis and Vascular Function in Rats with Family History of Hypertension. *Life Sci.* 2006;78(15):1726-32.
 18. Okruhlicova L, Dlugosova K, Mitasikova M, Bernatova I. Ultrastructural Characteristics of Aortic Endothelial Cells in Borderline Hypertensive Rats Exposed to Chronic Social Stress. *Physiological Research-Pre Press Article.* 2006.
 19. Nishio Y, Nakano Y, Deguchi Y, Terato H, Ide H, Ito C, dkk. Regular Article: Social Stress Induces Oxidative DNA Damage in Mouse Peripheral Blood Cells. *Genes and Environment.* 2007;29(1):17-22.
 20. Murphy KJ, Fassoulakis AK, Singh I, Francis MA, Pike MJ, Turner AH, dkk. Diet Containing Cocoa Powder With Flavanols and procyanidins Inhibits. *Proceedings of The Nutrition Society of Australia.* 2001;25:S79.
 21. Redón J, Oliva MR, Tormos C, Giner V, Chaves J, Iradi A, dkk. Antioxidant Activities and Oxidative Stress By Products in Human Hypertension. *Hypertension.* 2003;41:1096-101.
 22. Prior RL. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *Am J Clin Nutr.* 2003;78:570-78.
 23. Zhu QY, Holt RR, Lazarus SA, Orozco TJ, Keen CL. Inhibitory Effects of Cocoa Flavanols and Procyanidin Oligomers on Free Radical-Induced Erythrocyte Hemolysis. *Exp Biol Med.* 2002;227(5):321-29.
 24. Grassi D, Necozione S, Lippi C, Croce G, Valeri L, Pasqualetti P, dkk. Cocoa reduces Blood Pressure and Insulin Resistance and Improves Endothelium-Dependent Vasodilation in Hypertensives. *Hypertension.* 2005;46:398-405.