



Pemberian Ekstrak Cacao (*Theobroma Cacao L*) Pada Model Huvecs Preeklampsia Terhadap Kadar Interleukin 8

Budi Rahayu✉, Liberty Barokah

Program Studi DIII Kebidanan, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta

✉ budiayu88@gmail.com, Tlp: +285726449644

Genesis Naskah:

Diterima 16 April 2019; Disetujui 14 Mei 2019; Di Publikasi 9 Agustus 2019

Abstrak

Preeklampsia dan eklampsia adalah penyakit pada kehamilan yang menjadi salah satu penyumbang angka kematian Ibu khususnya di Indonesia. Tahapan pertama dari preeklampsia ini adalah terjadi abnormalitas dalam remodelling vaskular trofoblastik mengakibatkan disfungsi endotel, tahap kedua pelepasan faktor plasenta kedalam sirkulasi darah seperti *soluble fms-like tyrosine kinase* (sFlt-1), TNF- α , IL-6, IL-8, *angiotensin II tipe 1 reseptor antibodies* (AT1-AA), dan *thromboxan* (TX) menyebabkan respon inflamasi dan peningkatan aktivasi sel endotel. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kakao terhadap kadar IL-8 pada model HUVECs Preeklampsia. Penelitian true experimental dengan pendekatan yang digunakan *post test only control group design* yang dikerjakan dilaboratorium dengan *invitro*. Kultur HUVECs dibagi menjadi 5 kelompok masing-masing dilakukan replikasi 5x. Pengukuran kadar IL-8 menggunakan ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Analisis data yang digunakan pada penelitian ini adalah dengan uji *Anova one way* pada kadar IL-8, selanjutnya dilakukan uji perbandingan berganda (*Multiple Comparisons*) dengan uji Beda Nyata Terkecil/BNT (*Least Significant Difference/LSD*) Hasil penelitian pemberian ekstrak kakao pada kelompok kontrol positif dan 3 dosis kelompok perlakuan ternyata dapat menurunkan secara bermakna ($p\text{-value } 0.000 < \alpha 0.05$, *Anova One way*) kadar IL-8.

Kata Kunci : Pre Eklampsia; Model HUVECs Preeklampsia; Interleukin 8

The Effect Of Giving The Cacao (*Theobroma Cacao L*) Extract On Huvecs Preeclampsia Models To The Level Of Interleukin 8

Abstract

Preeclampsia and eclampsia are diseases in pregnancy which are one of the contributors to maternal mortality, especially in Indonesia. The first stage of preeclampsia is abnormalities in trophoblastic vascular remodeling resulting in endothelial dysfunction, the second stage of release of placental factors into the blood circulation such as *soluble fms-like tyrosine kinase* (sFlt-1), TNF- α , IL-6, IL-8, *angiotensin II type 1 receptor antibodies* (AT1-AA), and *thromboxan* (TX) cause an inflammatory response and increase endothelial cell activation. The purpose of this study was to determine the effect of giving cocoa extract to IL-8 lizards on the HUVECs Preeclampsia model. True experimental research with an approach used in the post test only control group design was carried out in the laboratory with *invitro*. HUVECs cultures were divided into 5 groups each replicating 5x. Measuring IL-8 levels using ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). The data analysis used in this study was an one way *Anova* test on IL-8 levels, then multiple comparisons were conducted with the *Least Significant Difference* (LSD). The results of the study were cacao extract in the control group. positive and 3 doses of the treatment group turned out to significantly reduce ($p\text{-value } 0.000 < \alpha 0.05$, *Anova One way*) IL-8 levels.

Keywords: Preeclampsia; HUVECs Preeclampsia Model; Interleukin 8

Pendahuluan

Menurut Depkes RI, 2012 menunjukkan angka Kematian Ibu di Indonesia (AKI) mengalami peningkatan dari 228 per 100.000 kelahiran hidup menjadi 359 per 100.000. Penyebab dari jumlah kematian ibu tersebut menurut analisis kematian ibu di Indonesia tahun 2010 adalah 50% kematian maternal disebabkan oleh pendarahan dan preeklampsia/ eklampsia (Depkes RI, 2012).

Preeklampsia merupakan “*the disease of theories*”, di mana patofisiologinya masih belum jelas diketahui (Chunningham, 2010). Preeklampsia merupakan karakteristik penyakit yang ditandai dengan kenaikan tekanan darah disertai dengan proteinuria pada wanita hamil dengan umur kehamilan setelah 20 minggu yang sebelumnya tidak mengalami hipertensi (Wang *et al.*, 2009). Sindrom preeklampsia merupakan kelainan dua tahap yaitu tahap pertama bersifat preklinis ditandai dengan kelainan dalam proses remodelling vaskular trofoblastik pada arteri uterinae yang akan mengakibatkan terjadinya hipoksia plasenta. Tahap kedua, pelepasan faktor plasenta ke dalam sirkulasi maternal seperti soluble fms-like tyrosine kinase (sFlt-1), TNF- α , IL-6, IL-8, angiotensin II tipe 1 reseptor antibodies (AT1-AA), dan thromboxan (TX) menyebabkan respon inflamasi dan peningkatan aktivasi sel endotel (Borzychowski, 2006; Gilbert *et al.*, 2008; Redman, 2010).

Kondisi preeklampsia atau eklampsia merupakan kondisi terjadinya kenaikan tekanan dan hipoksia pada endotel, akibat ketidakseimbangan substansi dari vasokonstriktor dan vasodilator karena disfungsi endotel (Dharma dkk., 2005; Susianto dkk., 2009). Kondisi disfungsi endotel menyebabkan peningkatan respon sitokin proinflamasi sehingga dibutuhkan antiinflamasi untuk merespon keadaan tersebut.

Biji kakao (*Theobroma cacao L*) salah satu yang memiliki potensi sebagai antiinflamasi dan antioksidan yang banyak mengandung polifenol (Hii *et al.*, 2009). Tiga kelompok utama polifenol kakao dapat dibedakan yaitu katekin (37%), antosianin (4%) dan proantosianidin (58%) (Hii *et al.*, 2009). Selain itu penelitian sebelumnya menjelaskan bahwa kakao berfungsi sebagai antiinflamasi dan mampu menghambat ekspresi sel adhesi molekul dan matrik protease sehingga meneka terjadinya pengeluaran faktor proinflamasi (Choi *et al.*, 2004)

Biji kakao (*Theobroma cacao L*) salah satu yang memiliki potensi sebagai antiinflamasi dan antioksidan yang banyak mengandung polifenol (Hii *et al.*, 2009). Ekstrak biji kakao (*Theobroma cacao L*) yang banyak mengandung epikatein tersebut diduga dapat menurunkan faktor proinflamatori pada disfungsi endotel.

Metode

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *true experimental* dengan pendekatan yang digunakan *post test only control group design* dikerjakan di laboratorium dengan *invitro* (Zainudin, 2011). Kelompok penelitian terdiri dari 5 bagian dan masing-masing akan dilakukan replikasi sebanyak 5 kali (Solimun, 2002). total keseluruhan jumlah sampel dengan masing-masing 5 replikasi adalah 30 sampel.

Kultur HUVECs setelah konfluent 80% pada hari ke 5 kemudian ditambahkan dengan plasma penderita preeklampsia 2% inkubasi overnight dan lakukan pengkoleksian supernatan untuk pengukuran ELISA.

Bahan untuk kultur sel endotel tali pusat steril, Media pengambilan umbilikus : delonized water, HEPES solution 2 ml, gentamycine, sodium hydrogen bicarbonat dan phenol red 4 ml, Hank's Balance Salt Solution (HBSS) 100 ml. Pencucian umbilikus untuk menghilangkan eritrosit menggunakan PBSA *ready to*

use. Bahan isolasi sel endothel : medium serum free, filer 0,2 µm, collagenase solution (SIGMA TYPE HA, C-6885). Bahan medium serum free : L-glutamin 2 mM 1,25 ml, medium 199 (SIGMA, M-5017), nabic, antibiotik menggunakan penisilin streptomisin 1 % dari volume total medium free. Bahan kultur sel endhotel : gelatin 0.2 % (SIGMA, G1393), endhotelial complete Medium 2 % (Serum free medium 80 ml ditambah FBS (Fetal Bovine Serum) sebanyak 10-15 %).

Bahan Plasma preeklampsia 2% adalah medium preeklampsia yang terdiri dari ½ medium komplit ditambah dengan FBS (*Fetal Bovine Serum*) 5-7.5%, kemudian ditambahkan plasma penderita preeklampsia sebanyak 2% dari total medium preeklampsia yang dibutuhkan pada kultur HUVECs.

Bahan pemeriksaan kadar IL-8 menggunakan supernatan HUVECs diukur dengan menggunakan metode ELISA. Siapkan reagen dalam suhu ruang, atur elisa reader dengan panjang gelombang 450 nm-570 nm, membuat standart dilution sebanyak 7, membuat PBS, menyiapkan microplate dan lakukan pencucian dengan wash buffer, tambahkan asay buffer 50 µL, tambahkan standard dilution 50 µL pada well

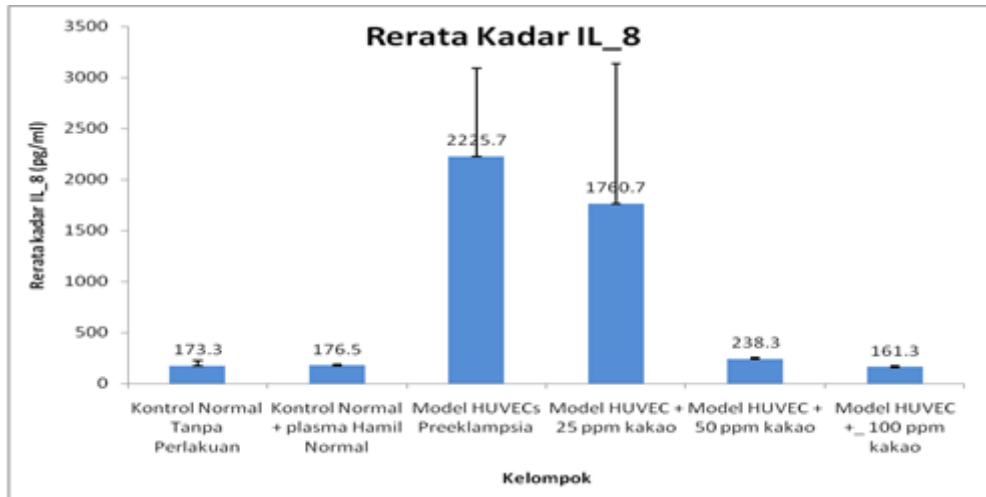
standar dan sampel 50 µL kemasing-masing well sampel, tutup dengan perekat plate, inkubasi 2 jam, pencucian dengan wash soluttion 4x, tambahkan Human IL-8 Detection Antibodi kedalam masing-masing well inkubasi 30 menit, lakukan pencucian dengan wash solution 4x, tambahkan 100 µL *Avidin HRP-A Solution* well tutup dengan perekat inkubasi 30 menit, pencucian 5x dengan wash solution, Tambahkan 100 µL Substrate Solution F inkubasi 15 menit, tambahkan menambahkan 100 µL Stop Solution F pada masing-masing well, pembacaan dengan elisa reader, hitung OD.

Hasil Penelitian dan Pembahasan

Data hasil uji *Anova one way* pada kadar IL-8 diperoleh ada perbedaan yang bermakna rerata kadar IL-8 kelima kelompok sampel pengamatan, hal ini ditunjukkan dengan nilai *p-value* $0.000 < \alpha$. Selanjutnya pada uji perbandingan berganda (*Multiple Comparisons*) dengan uji Beda Nyata Terkecil/BNT (*Least Significant Difference/LSD*) diperoleh hasil sebagai berikut. berdasarkan hasil uji perbandingan berganda dengan uji *LSD*.

Tabel 1. Hasil Pengukuran kadar IL-8 (pg/mL) pada HUVEC Model Preeklampsia dan HUVEC Model Preeklampsia diberi Perlakuan Ekstrak Kakao

Kelompok pengamatan	Rerata ± stan.dev	<i>p-value</i>
Kontrol Normal tanpa perlakuan (K1)	173.3 ± 52.78	
Model HUVECs preeklampsia (K2)	2225.7±863.3 ^a	
HUVECs+ 25 ppm kakao (K3)	1760.7±1374 ^a	0.000 < 0.05
HUVECs+ 50 ppm kakao (K4)	238.3±19.8 ^b	
HUVECs+ 100 ppm kakao (K5)	161.3±12.6 ^b	



Gambar 1. Histogram Rerata kadar IL-8

Gambar diatas menunjukkan histogram rerata kadar IL-8 pada kelompok kontrol normal (K1), kelompok kontrol model (K2) dan 3 kelompok HUVEC model yang dipapar ekstrak biji kakao dosis 25 ppm, 50 ppm, dan 100 ppm. Tampak ada penurunan rerata kadar IL-8 seiring dengan pertambahan dosis ekstrak biji kakao. Adapun nilai rerata kadar IL-8 terendah sekaligus terdekat dengan rerata kadar IL-8 pada kelompok kontrol normal tanpa perlakuan (173.3 ± 52.78 pg/ml) adalah pada kelompok perlakuan pemberian ekstrak biji kakao dosis 100 ppm (161.3 ± 12.6^b pg/ml).

Hal ini dapat dikatakan bahwa dalam penelitian ini dosis ekstrak biji kakao yang dianggap paling menurunkan kadar IL-8 dan optimum adalah dosis 100 ppm. Jadi dengan kata lain dosis optimum ekstrak biji kakao 100 ppm mampu menurunkan kadar IL-8 yang sangat bermakna.

Penelitian ini menunjukkan hasil pemberian ekstrak biji kakao mampu menurunkan kadar IL-8 pada kultur HUVECs model preeklampsia seperti kadar IL-8 pada kelompok HUVECs normal yang ditunjukkan pada tabel 1. Pada penelitian ini dosis ekstrak kakao yang dianggap sudah mampu

menurunkan kadar IL-8 kelompok model HUVECs preeklampsia seperti kadar IL-8 pada kelompok HUVECs normal adalah dosis ekstrak kakao 50 ppm dan 100 ppm. Akan tetapi dosis yang paling rendah menurunkan kadar IL-8 kelompok model HUVECs preeklampsia seperti kadar IL-6 pada HUVECs normal adalah dosis ekstrak biji kakao 100 ppm. Penelitian secara *invitro* memperlihatkan bahwa pemberian ekstrak kakao antara 2 jam-20 jam pada kultur HUVECs yang diinduksi LPS dengan dosis ekstrak kakao yang berbeda antara 0,05-50 $\mu\text{g/mL}$ mampu secara signifikan mencegah kerusakan sel endotel (Rusconi *et al.*, 2010). Penelitian yang dilakukan pada manusia dengan kondisi yang mengalami stres oksidatif dengan mengkonsumsi kakao mampu secara signifikan meningkatkan produksi NO dan menekan faktor proinflamasi seperti IL-8 (Sies *et al.*, 2005; Rusconi *et al.*, 2010).

Hasil menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna rerata kadar IL-8 antara kelompok kontrol model HUVECs preeklampsia (K3) (2225.7 ± 863.3^a pg/mL) dengan kelompok perlakuan pemberian ekstrak biji kakao 25 ppm (K4) (1760.7 ± 1374^a pg/mL). Hasil berbeda pada dosis kakao 50 ppm yaitu ada perbedaan yang

bermakna rerata kadar IL-8 antara kelompok model HUVECs preeklampsia (K3) (2225.7 ± 863.3^a pg/mL) dengan kelompok perlakuan pemberian ekstrak biji kakao 50 ppm (K5) (238.3 ± 19.8^b). Pada dosis 100 ppm juga menunjukkan ada perbedaan yang bermakna rerata kadar IL-8 antara kelompok kelompok model HUVECs preeklampsia (K3) (2225.7 ± 863.3^a pg/mL) dengan kelompok perlakuan pemberian ekstrak biji kakao 100 ppm (K6) (161.3 ± 12.6^b).

Hasil dari penelitian menunjukkan ada perbedaan yang bermakna rerata kadar IL-8 antara kelompok perlakuan pemberian ekstrak biji kakao dosis 25 ppm (K4) (1760.7 ± 1374^a) dengan kelompok perlakuan pemberian ekstrak biji kakao dosis 50 ppm (K5) (238.3 ± 19.8^b pg/ml) dan ada perbedaan bermakna dengan pemberian ekstrak biji kakao dosis 100 ppm (K6) (161.3 ± 12.6^b pg/ml). Berdasarkan nilai reratanya tampak ada penurunan rerata kadar IL-8 seiring pertambahan dosis ekstrak biji kakao. Sedangkan nilai rerata kadar IL-8 antara kelompok perlakuan pemberian ekstrak biji kakao 50 ppm (K5) (238.3 ± 19.8^b pg/ml) dengan kelompok perlakuan pemberian ekstrak biji kakao 100 ppm (K6) (161.3 ± 12.6^b pg/ml) menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna dan menunjukkan ada penurunan kadar IL-8 seiring pertambahan dosis ekstrak biji kakao.

Penelitian Balzer menyebutkan konsumsi flavonoid yang terkandung pada kakao mampu meningkatkan fase dilatasi pembuluh darah perifer dan memperbaiki fungsi vaskuler pada pasien dengan penyakit jantung dengan cara menurunkan faktor proinflamasi seperti IL-8 dan menaikkan NO untuk dilatasi vaskuler (Balzer *et al.*, 2008). Pada penelitian Jenny menyebutkan bahwa ekstrak kakao secara signifikan mampu menekan faktor proinflamasi dikarenakan fungsi dari ekstrak kakao

adalah sebagai antiinflamasi dan antioksidan (Jenny *et al.*, 2009).

Beberapa studi mengatakan bahwa mekanisme antiinflamasi dari diet tinggi polifenol yang terkandung dalam kakao mampu menghambat molekul proinflamasi seperti CRP, IL-8 dan TNF α . Pada penelitian *invitro* mengatakan bahwa metabolisme proksianidin dan polifenol kakao mampu memodifikasi transduksi signal pathway intraseluler, dengan demikian diduga dapat memodulasi sintesis sitokin proinflamasi seperti IL-6, IL-8, IL-1 β , atau -2 (Vazquez-Agell *et al.*, 2011). Pada konsentrasi 58 μ g/mL konsentrasi ekstrak kakao mampu menurunkan ekspresi TNF α dan level mRNA IL-8 pada kultur IL HUVECs yang diinduksi LPS (Chen, 1996; Andujar *et al.*, 2012).

Kesimpulan

Pemberian ekstrak biji kakao (*Theobroma cacao L*) mampu menurunkan kadar IL-8 pada HUVECs model Preeklampsia. Dosis ekstrak biji kakao 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm mampu menurunkan kadar IL-8 seperti kondisi kultur HUVECs normal. Disarankan penelitian lanjutan untuk menganalisis pengaruh ekstrak biji kakao dalam kondisi individu yang utuh melalui studi *invivo* pada manusia maupun hewan coba kemudian dikonversikan dengan dosis untuk manusia dan hewan.

Daftar Pustaka

- UNICEF. KESEHATAN IBU DAN ANAK. 2012. (Cited 1 November 2016) Available from (https://www.unicef.org/indonesia/id/A5_-_B_Ringkasan_Kajian_Kesehatan_REV.pdf.)
- Departemen Kesehatan RI. Profil Kesehatan RI 2012. 2012. (Cited 10 Oktober 2016) available from (www.depkes.go.id/resources/download/.../profil-kesehatan-indonesia-2012.pdf.)
- Cunningham, F.G., Mac Donald, P.C., Gant, N.F., Leveno, K.J., Gilstrap, L.C., Haskins, G.D. Williams Obstetrics, 23th ed. London: Prentice-Hall International. 2010.

- Wang A., Rana S., Karumanchi A.S. Preeclampsia : The Role of Angiogenic Factors in Its Pathogenesis. *Physiology*, 2009, 24 : 147-158.
- Borzychowski, A.M., Sargent, I.L., Redman, C.W. Inflammation and Preeclampsia. *Semin Fetal Neonatal Med*, 2006, 11 (5) : 309-316.
- Gilbert, J.S., Ryan M.J., La marca Babbette B., Sedek Mona, Murphy Sydeny R., Granger, J. P. Pathophysiology of Hypertension during Preeclampsia : Linking Placental Ischemia with Endothelial Dysfunction. *Am J Obstet Gynecol*, 2008, 294 :H541-H550.
- Redman, C.W.G., Sargent, I.L., Immunology of Pre-Eclampsia. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2010, 63 : 534-543.
- Dharma, R., Wibowo, N., Raranta, P.T.H. 2005. Disfungsi Endotel pada Preeklampsia. *Makara Kesehatan*. 9 (2) : 63-69.
- Susianto, I.A., Suharsono, Hadijono S. 2009. Kadar TNF- α , IL-6 dan Trofoblas pada Preeklampsia – Eklampsia. *Medika Media Indonesia*. 43 (4): 166-173.
- Choi Jung-Suk, Choi Yean-Jung, Park Sung-Hee, Kang Jung-Sook, Kang Young-Hee. 2004. Flavones Mitigate Tumor Necrosis Factor- α -Induced Adhesion Molecule Upregulation in Cultured Human Endothelial Cells : role Nuclear factor-kB. *The Journal of Nutrition*.
- Solimun. 2002. *Multivariate Analisis Structural Equation Modeling*. Malang: Universitas Negeri Malang.
- Hii, C.L., Law, C. L., Suzannah, S., Misnawi, & Cloke, M. Polyphenol in Cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 2009, 2 (4) : 702-722.
- Zainuddin, M. *Metodologi Penelitian*. Surabaya: Unair Press. 2011.
- Rusconi, M., Conti, A. *Theobroma cacao* L., The Foods of Gods : A Scientific Approach Beyond Myths and Claims. *Pharmacological Research*, 2010, 61 (2010): 5-13.
- Sies, H., Schewe, T., Heiss, C., Kelm, M. Cocoa Polyphenols and Inflammatory Mediators. *Am J Clin Nutr*, 2005, 81 : 304S-12S.
- Balzer, J., Rassaf T., Heiss, C., Kleinbonggard, P., Lauer, T., Merx, M., Heussen, N., Gross, H.B., Keen, C.L., Schroeter, H., Kelm, M. Sustained benefit in Vascular Function Through Flavanol-Containing Cocoa in Medicated Diabetic Patients, *Journal of the American College of Cardiology*, 2008, 51 (22): 2141-9.
- Jenny, M., Santer E., Klein A., Ledochowski M., Schennach H., Ueberall F., Fuchs D. Cacao Extracts Suppress Tryptophan Degradation of Mitogen Stimulated peripheral Blood Mononuclear Cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009, 122 : 261-267.
- Chen, C., Manning, A.M. TGF- β 1, IL-10 and IL4 differentially Modulate The cytokine-Induced Expression of IL-6 and IL-8 in Human Endothelial Cells. *Cytokine*, 1996, 8 (1): pp 58-65.
- Andujar, Recio, M.C., Giner, R.M., Rios, J.L. Cocoa Polyphenols and Their Potential benefit for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 906352: 23.
- Vazquez-Agell, M., Urpi-Sarda, M., Sacanella E., Camino-Lopez, S., Chiva-Blanch, G., Llorente-Cortes, V., Tobias, E., Roura, E., Andres-Lacueva, C., Lamuela-Raventos, R.M., Badimon, L., Estruch R. Cocoa Consumption Reduces NF-kB activation in Peripheral Blood, 2011.