

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit kardiovaskuler (PKV) merupakan penyebab utama kesakitan dan kematian di dunia. Pada tahun 2008, PKV menyebabkan 17,3 juta kematian atau 30% dari total kematian saat itu. Angka kematian tersebut terdiri atas penyakit jantung koroner (PJK) 7,3 juta, *stroke* 6,2 juta, dan komplikasi hipertensi 9,4 juta. Pada tahun 2030, angka kematian akibat PKV diperkirakan meningkat menjadi 23,6 juta atau 37% dari total kematian yang diperkirakan (WHO, 2012).

Di Indonesia, belum ada data lengkap mengenai epidemiologi PKV, namun berdasarkan data yang ada, tingkat kesakitan dan kematian PKV cukup besar serta cenderung meningkat. Berdasarkan Riskesdas 2013, penyakit kardiovaskuler yang didiagnosis tenaga kesehatan menunjukkan peningkatan dibanding tahun 2007, prevalensi hipertensi dari 7,6% menjadi 9,5%; *stroke* dari 8,3 per 1000 orang menjadi 12,1 per 1000 orang; sedangkan PJK yang merupakan PKV dengan tingkat kematian yang tinggi, tetap sebesar 1,5%. Data Riskesdas 2018 menunjukkan penyakit kardiovaskular menunjukkan prevalensi sebagai berikut: hipertensi 8,4%; *stroke* 10,9 per 1000 orang dan PJK 1,5%. Hasil Survey Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) tahun 2001 menunjukkan persentase kematian akibat PKV mulai tahun 1982 sebesar 9,1%, 1986 sebesar 16%, 1995 sebesar 19%, dan 2001 sebesar 26,3% serta menduduki peringkat pertama penyebab kematian umum (Surkesnas, 2001).

Sebesar 10% dari PKV disebabkan merokok (Mendis *et al.*, 2011). Kebiasaan merokok meningkatkan risiko PKV 2-3 kali (Ridker *et al.*, 2015), sedangkan risiko PJK 2-4 kali (Mackay, 2004). Selain itu, merokok juga dikaitkan dengan peningkatan risiko kematian PKV. Sekitar 24% kematian akibat PJK pada laki-laki dan 11% pada perempuan disebabkan kebiasaan merokok (Huon, 2002). Studi epidemiologi memperkirakan 1 dari 3 orang perokok meninggal akibat PKV (Rodella *et al.*, 2010).

Indonesia merupakan negara ke tiga dengan jumlah perokok terbanyak di dunia setelah China dan India, yaitu sekitar 65 juta perokok atau 27,6% per penduduk (WHO, 2008). Walaupun pemerintah telah melakukan beberapa kebijakan untuk mengurangi jumlah perokok seperti larangan merokok di tempat umum dan pemasangan gambar bahaya merokok, perilaku merokok penduduk Indonesia cenderung meningkat. Hasil *survey* menunjukkan bahwa prevalensi merokok usia 10 - 18 tahun, menurut Riskesdas 2013 sebesar 7,2%, Surkesnas 2016 sebesar 8,8% dan Riskesdas 2018 sebesar 9,1%. Menurut *Global Youth Tobacco Survey* 2014, sebanyak 36,2% remaja laki-laki dan 4,3% remaja perempuan (20,3% remaja) di Indonesia adalah pengguna tembakau. Sebanyak 43,2% merokok di usia 12-13 tahun.

Asap rokok mengandung nikotin, CO, tar, serta banyak jenis dan jumlah oksidan yang dapat memicu berbagai efek patologis, antara lain pada endotel (Barbara and David, 2014). Secara *in vitro*, mekanisme kerusakan endotel oleh asap rokok diketahui melalui peningkatan *reactive oxygen species* (ROS), yang mengakibatkan terjadinya peroksidasi lipid pada membran sel endotel dengan produk akhir, antara lain F2-isoprostan. Saat ini F2 isoprostan merupakan *marker* stres oksidatif atau lipid

peroksidasi *in vivo* yang paling baik, sangat stabil, dan secara signifikan lebih akurat dari *marker* lain (Patrignani *and* Tacconelli, 2005). Hung *and* Bruton (2006) menyatakan bahwa kadar total F2 isoprostan dapat menggambarkan kondisi stres oksidatif yang sebenarnya, sedangkan Chandra *et al.* (2016) membuktikan bahwa F2-isoprostan dapat dipakai sebagai indikator awal proses aterosclerosis.

Asap rokok juga menyebabkan terjadinya proses inflamasi melalui aktivasi *Nuclear Factor kappa B* (NFkB) yang memicu peningkatan sitokin pro-inflamasi antara lain *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), *interleukin-1 β* (IL-1 β) dan *interleukin 6* (IL-6). Sitokin pro-inflamasi tersebut menyebabkan aktivasi endotel, ditandai dengan peningkatan ekspresi molekul adhesi seperti *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) dan *intracellular cell adhesion molecule-1* (ICAM-1) pada permukaan endotel. Kondisi tersebut akan menurunkan sifat *anti-adhesive* endotel yang merupakan tanda terjadinya disfungsi endotel (Pott, 2017). VCAM-1 dan ICAM-1 berperan dalam aterosclerosis melalui adhesi monosit dan limfosit ke endotel yang akan meningkatkan akumulasi monosit pada tunika intima arteri (Libby, 2002).

Selain menyebabkan kerusakan endotel, asap rokok juga mengganggu proses regenerasi dan pemeliharaan endotel. Proses regenerasi endotel sebagian dilakukan oleh *endothelial progenitor cells* (EPCs) baik melalui sistem parakrin (antara lain *Vascular Endothelial Growth Factor*, *Fibroblast Growth Factor*, IL-6, IL-8, IL-11) atau berdiferensiasi menjadi sel endotel untuk menggantikan endotel yang mengalami kerusakan. Penanda EPC yang sering digunakan adalah *Cluster of differentiation 133+* (CD133+), CD34+ dan *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2+* (VEGFR2+) atau *Fetal Liver Kinase-1* (Flk-1). Beberapa hasil penelitian menunjukkan

bahwa EPC yang terdapat di dalam sumsum tulang maupun yang beredar dalam pembuluh darah mempunyai hubungan yang kuat dengan perbaikan fungsi endotel (Rainer *et al.*, 2007). Penelitian oleh Heiss, *et al.* (2008) menunjukkan asap rokok menurunkan jumlah dan aktivitas fungsional EPC sirkulasi darah dengan *marker* CD34+ dan VEGFR2 sehingga akan mengganggu proses regenerasi endotel.

Rokok menimbulkan banyak efek negatif bagi tubuh manusia. Beberapa jenis pengobatan farmakologi maupun non-farmakologi telah tersedia tetapi belum terbukti khasiatnya (Sadikin *et al.*, 2008). Oleh karena itu diperlukan upaya lain untuk mengatasi PKV akibat tingginya angka merokok. Salah satu upaya yang dapat dilakukan adalah pemanfaatan tanaman herbal. Data epidemiologi menunjukkan bahwa asupan makanan yang teratur dari tanaman herbal tertentu dapat mengurangi resiko PKV. Kakao (*Theobroma cacao*) atau coklat merupakan bahan makanan yang terbukti bermanfaat bagi kesehatan kardiovaskuler. Penelitian Bayard *et al.* (2007) pada penduduk Indian Kuna di lepas pantai Panama yang terbiasa mengkonsumsi kakao setiap hari menunjukkan kematian PKV lebih rendah dibandingkan dengan warga negara lain (9.2 ± 3.1 versus 83.4 ± 0.7 , kematian disesuaikan usia per 100'000).

Kakao merupakan bahan makanan yang kaya akan polifenol dibanding bahan makanan lain seperti apel, bawang putih, dan anggur (Perez *et al.*, 2010). Polifenol kakao terdiri atas 29%-38% *catechin*, 4% *anthocyanin* dan 58-65% *proanthocyanidin* (Aprotosoaie *et al.*, 2016). Selain itu, kakao juga mengandung *methylxanthine*, dengan senyawa utama *theobromin* (Galleano *et al.*, 2009). Penelitian eksperimental dan uji klinis yang ada menunjukkan bahwa potensi kardioprotektif dari polifenol kakao dimediasi melalui efek anti-aterogenik, antioksidan, anti-inflamasi, dan perbaikan

disfungsi endotel (Katz *et al.*, 2011; Aprotosoai *et al.*, 2016; Rimbach *et al.*, 2009).

Beberapa tahun terakhir, penelitian kakao terhadap PKV pada perokok maupun bukan perokok mulai dilakukan. Heiss *et al.* (2007) melaporkan bahwa pemberian kakao secara akut yaitu 6 jam setelah pemberian *single dose*, maupun kronik selama 7 hari dapat memperbaiki disfungsi endotel akibat asap rokok yang ditunjukkan dengan peningkatan *flow-mediated dilation* (FMD). Heiss *et al.* (2010) melaporkan bahwa konsumsi makanan tinggi flavonoid pada pasien PJK dapat meningkatkan mekanisme regenerasi endotel dengan menstimulasi mobilisasi *circulating angiogenic cell* (CAC) yang dikenal sebagai *early EPC*. Berdasarkan penelitian tersebut, potensi kardioprotektif kakao juga dimediasi melalui aktivasi EPC.

Hasil penelitian produk kakao atau polifenol kakao terhadap kesehatan kardiovaskuler, sebagian masih kontroversial. Penelitian epidemiologi menunjukkan bahwa *polyphenol* kakao berpengaruh terhadap peroksidasi lipid yang ditandai dengan penurunan kadar F2-isoprostan plasma. Namun, banyak penelitian *in vivo* menunjukkan hasil berbeda (Aprotosoai *et al.*, 2016). Lebih lanjut, terdapat perbedaan rekomendasi dosis kakao dari beberapa peneliti yang didasarkan hasil penelitian masing-masing. *European Food Safety Authority* (EFSA) merekomendasikan untuk mengonsumsi 200 mg flavanols atau 46 mg *epicatechin* kakao per hari, yang terdapat pada 2,5 g bubuk kakao tinggi flavanol atau 10 g *dark chocolate* tinggi flavanol untuk menjaga elastisitas pembuluh darah. Sebaliknya, dosis ini masih menjadi bahan diskusi oleh Vlachojannis *et al.*, (2016) yang menyatakan bahwa produk kakao dengan dosis 900 mg flavanol atau 100 mg *epicatechin* kakao yang dapat memperbaiki disfungsi endotel, ditunjukkan dengan peningkatan FMD dan penurunan tekanan darah.

Berdasarkan penjelasan di atas, disfungsi endotel memainkan peranan penting terhadap aterosclerosis. Perbaikan fungsi endotel segera setelah jejas merupakan langkah kunci dalam upaya mencegah aterosclerosis. Kakao dengan kandungan tinggi polifenol, diharapkan menjadi pilihan tepat sebagai bahan herbal dalam mencegah disfungsi endotel akibat asap rokok. Namun, dosis dan mekanisme pencegahan disfungsi endotel oleh kakao akibat asap rokok yang menghubungkan efek antioksidan, anti-inflamasi dan aktivasi EPC masih belum diketahui dengan jelas.

Oleh karena itu, penelitian tentang mekanisme pencegahan disfungsi endotel oleh kakao akibat paparan asap rokok perlu dilakukan. Penelitian ini dimulai dengan penelitian tahap satu, menentukan dosis efektif kakao dalam mencegah disfungsi endotel akibat asap rokok melalui kemampuannya dalam menurunkan indikator stres oksidatif yaitu F2-isoprostan. Selanjutnya penelitian tahap dua, menganalisis mekanisme molekular pencegahan disfungsi endotel oleh kakao (*Theobroma cacao*) pada jalur inflamasi melalui ekspresi NF κ B *arteria coronaria*, serta aktivasi EPC dengan indikator ekspresi CD34 dan Flk-1 *arteria coronaria*. Indikator pencegahan disfungsi endotel yang digunakan adalah penurunan ekspresi VCAM-1 dan ICAM-1 *arteria coronaria*. Penelitian ini dilakukan melalui pendekatan eksperimental menggunakan tikus putih *strain Sprague dawley* yang terpapar asap rokok. Pada penelitian ini digunakan bubuk kakao karena banyak dipakai sebagai bahan dasar berbagai produk makanan dan minuman serta memiliki kandungan polifenol yang lebih tinggi dari bentuk olahan kakao yang lain (Mulato dan Suharyanto, 2014).

1.2 Rumusan Masalah

1.2.1 Tahap 1

Berapakah dosis efektif kakao (*Theobroma cacao*) yang dapat menurunkan kadar F2-isoprostan plasma pada tikus putih yang terpapar asap rokok?

1.2.2 Tahap 2

1. Apakah pemberian kakao (*Theobroma cacao*) menurunkan kadar F2-isoprostan plasma pada tikus putih yang terpapar asap rokok?
2. Apakah pemberian kakao (*Theobroma cacao*) menurunkan ekspresi NFkB arteria coronaria pada tikus putih yang terpapar asap rokok?
3. Apakah pemberian kakao (*Theobroma cacao*) meningkatkan ekspresi CD34 arteria coronaria pada tikus putih yang terpapar asap rokok?
4. Apakah pemberian kakao (*Theobroma cacao*) meningkatkan ekspresi Flk-1 arteria coronaria pada tikus putih yang terpapar asap rokok?
5. Apakah pemberian kakao (*Theobroma cacao*) mencegah disfungsi endotel (menurunkan ekspresi VCAM-1 dan ICAM-1 arteria coronaria) pada tikus putih yang terpapar asap rokok?
6. Bagaimana hubungan antara penurunan kadar F2-Isoprostan plasma, penurunan ekspresi NFkB, peningkatan ekspresi CD34 dan Flk-1 dengan pencegahan disfungsi endotel (penurunan VCAM-1 dan ICAM-1) oleh kakao (*Theobroma cacao*) pada tikus putih yang terpapar asap rokok?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Menjelaskan mekanisme pencegahan disfungsi endotel oleh kakao (*Theobroma cacao*) pada jalur stres oksidatif (kadar F2-isoprostan plasma), inflamasi (ekspresi NFkB *arteria coronaria*) dan aktivasi EPC (CD34 dan Flk-1 *arteria coronaria*) akibat paparan asap rokok menggunakan tikus putih *strain Sprague dawley*.

1.3.2 Tujuan khusus

1. Tahap 1

Menganalisis dosis kakao (*Theobroma cacao*) yang efektif dalam menurunkan kadar F2-isoprostan plasma pada tikus putih yang terpapar asap rokok

2. Tahap 2

- a. Menganalisis penurunan kadar F2-isoprostan plasma pada tikus putih yang diberi kakao (*Theobroma cacao*) dan terpapar asap rokok
- b. Menganalisis penurunan ekspresi NFkB *arteria coronaria* pada tikus putih yang diberi kakao (*Theobroma cacao*) dan terpapar asap rokok
- c. Menganalisis peningkatan ekspresi CD34 *arteria coronaria* pada tikus putih yang diberi kakao (*Theobroma cacao*) dan terpapar asap rokok
- d. Menganalisis peningkatan ekspresi Flk-1 *arteria coronaria* pada tikus putih yang diberi kakao (*Theobroma cacao*) dan terpapar asap rokok
- e. Menganalisis pencegahan disfungsi endotel (penurunan VCAM-1 dan ICAM-1 *arteria coronaria*) pada tikus putih yang diberi kakao (*Theobroma cacao*) dan terpapar asap rokok

- f. Menganalisis hubungan antara penurunan kadar F2-isoprostan plasma, penurunan ekspresi NFκB, peningkatan CD34 dan Flk-1 *arteria coronaria* dengan pencegahan disfungsi endotel (penurunan VCAM-1 dan ICAM-1) oleh kakao (*Theobroma cacao*) pada tikus putih yang terpapar asap rokok

1.4 Manfaat

1.4.1 Manfaat teoritis

Memberikan informasi ilmiah tentang mekanisme pencegahan disfungsi endotel oleh kakao (*Theobroma cacao*) akibat asap rokok melalui analisis mekanisme molekuler, yaitu pada jalur stres oksidatif, inflamasi dan aktivasi EPC.

1.4.2 Manfaat praktis

Dasar pengembangan *Theobroma cacao* sebagai alternatif bahan herbal dalam mencegah disfungsi endotel akibat asap rokok.