

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Radikal Bebas

Radikal bebas (*free radical*) atau sering dikenal dengan *Reactive Oxygen Species* (ROS) merupakan molekul yang kehilangan satu buah elektron dari pasangan elektron bebasnya. Radikal bebas terbentuk dari hasil pemecahan hemolitik suatu ikatan kovalen. Radikal bebas memiliki sifat yang sangat reaktif dan memiliki waktu paruh yang sangat cepat. Radikal bebas dapat segera bereaksi dengan mengambil molekul di sekitarnya.²³

Radikal bebas dapat merusak jaringan normal terutama dalam jumlah banyak. Akibat yang dapat ditimbulkan dari aktivitas radikal bebas berupa gangguan produksi DNA, lapisan lipid pada dinding sel, pembuluh darah, prostaglandin, kerusakan sel serta mengurangi kemampuan sel untuk beradaptasi dengan lingkungannya.²³⁻²⁵

Salah satu marker radikal bebas dalam tubuh adalah malondialdehid (MDA). Malondialdehid (MDA) terbentuk dari peroksidasi lipid pada membran sel, yaitu reaksi antara radikal bebas (radikal hidroksi) dengan *poly unsaturated fatty acid* (PUFA). Reaksi tersebut terjadi secara berantai yang menghasilkan hasil akhir berupa hidrogen peroksida. Hidrogen peroksida menyebabkan dekomposisi beberapa produk aldehyd yang bersifat toksik terhadap sel.^{23,24,26}

Secara fisiologis, radikal bebas digunakan dalam tubuh manusia dalam sistem transportasi elektron dan perkembangan sel. Radikal bebas juga sangat berperan dalam sistem imun seperti membantu sel darah putih (leukosit) untuk menghancurkan kuman yang masuk ke tubuh. Ketidakseimbangan antara radikal bebas dengan antioksidan disebut stres oksidatif. Tubuh secara alami memiliki mekanisme pertahanan terhadap radikal bebas, yaitu dengan antioksidan endogen intrasel yang terdiri dari enzim-enzim yang disintesis oleh tubuh seperti superoksida dismutase (SOD), katalase dan glutathion peroksidase.^{24,25}

2.2 Malondialdehid (MDA)

Malondialdehid (MDA) merupakan salah satu produk sekunder hasil akhir dekomposisi radikal yang terbentuk melalui reaksi peroksidasi lipid pada membran sel, yaitu reaksi antara radikal bebas (radikal hidroksi) dengan *poly unsaturated fatty acid* (PUFA) secara berantai. Peroksidasi lipid menghasilkan hasil akhir berupa hidrogen peroksida yang menyebabkan dekomposisi beberapa produk aldehid yang bersifat toksin terhadap sel. Selain MDA, terdapat produk sekunder lainnya yaitu heksanal, propanal, dan 4-hidroksinoneal (4-HNE).²⁶

MDA merupakan produk peroksidasi lipid yang paling mutagenik apabila bereaksi dengan deoksiguanosin dan deoksiadenosin membentuk 3-(2'-deoxy-beta-D-erythro-pentofuranosyl)pyrimido[1,2-a]-purin-10(3H)-one atau disebut juga M1G pada DNA, sedangkan 4-HNE merupakan

produk peroksidasi lipid yang paling toksik. MDA dan 4-HNE memiliki aktivitas biologis yang berkontribusi terhadap aktivasi respon stres dan memicu kerusakan pada DNA.^{23,26}

Malondialdehid di dalam tubuh berfungsi sebagai *signaling messenger* yang mengatur *glucose-stimulated insulin secretion* (GSIS) dalam pankreas serta sebagai induktor ekspresi gen-kolagen dengan mengatur ekspresi gen *specifity protein-1* (Sp1) dan *specifity protein-3* (Sp3).²⁷⁻²⁹

2.3 Pembentukan dan Metabolisme MDA

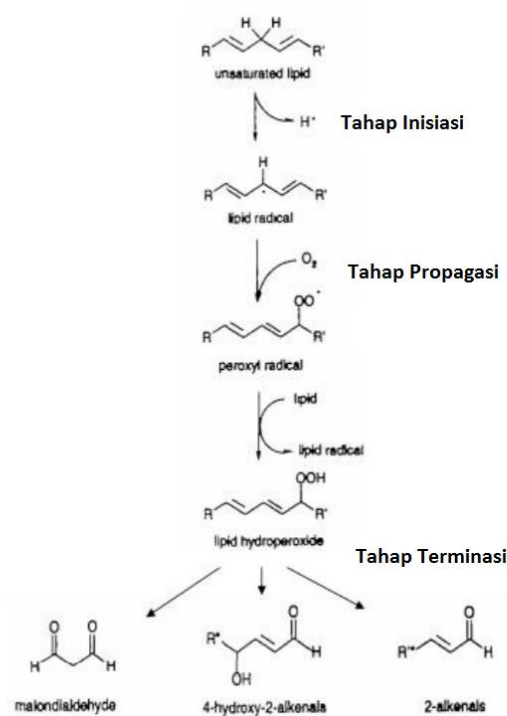
Di dalam tubuh, MDA dapat dihasilkan melalui proses enzimatik dan proses non enzimatik. Pembentukan MDA secara enzimatik dihasilkan dari asam arakhidonat dan PUFA melalui proses biosintesis tromboksan A₂ dan *12-1-hydroxy-5,8,10-heptadecatrienoic acid* (HHT) secara in vivo yang kemudian menghasilkan produk sampingan berupa MDA.²⁶

Pembentukan MDA non-enzimatik diproduksi sebagai hasil dari proses peroksidasi lipid akibat radikal bebas yang diawali oleh aktivitas radikal bebas pada ikatan lemak tak jenuh pada membran sel. Tahap pertama adalah proses inisiasi, yaitu terbentuknya radikal bebas (R*) bila lipida kontak dengan panas, cahaya, ion metal dan oksigen. Reaksi ini terjadi pada grup metilen yang berdekatan dengan ikatan rangkap $-C=C$.^{16,26}

Tahap selanjutnya adalah tahap propagasi dimana autooksidasi terjadi ketika lipida (R*) hasil tahap inisiasi bertemu dengan oksigen membentuk radikal peroksida (ROO*). Radikal peroksida yang terbentuk

akan mengekstrak ion hidrogen dari lipida lain ($R_1 H$) membentuk hidroperoksida ($ROOH$) dan molekul radikal lipida baru (R_1^*). Selanjutnya reaksi autooksidasi ini akan berulang sehingga merupakan reaksi berantai.^{16,26}

Tahap terakhir dari oksidasi lipid adalah tahap terminasi, dimana hidroperoksida yang sangat stabil pecah menjadi senyawa organik berantai pendek seperti aldehid, keton, alkohol dan asam. Salah satu produk dari peroksidasi lipid ini adalah MDA yang bersifat toksik pada membran sel dan dapat berikatan dengan protein sel, jaringan maupun DNA untuk membentuk aduksi yang bermanifestasi terhadap kerusakan biomolekuler, sehingga dapat memicu berbagai penyakit degeneratif, kanker, penuaan dan lain-lain^{16,26} (Gambar 1).

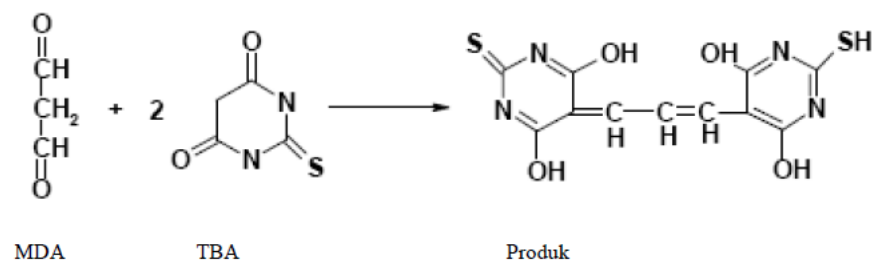


Gambar 1. Pembentukan dan Metabolisme MDA³⁰

2.4 Thiobarbituric Acid Reactive Substance (TBARS)

Kadar MDA dalam material biologi telah lama digunakan sebagai biomarker stres oksidatif dan radikal bebas. Salah satu metode yang dapat mengukur kadar MDA adalah *Thiobarbituric Acid Reactive Substance* (TBARS). TBARS merupakan metode kolorimetri dengan menggunakan *thiobarbituric acid* (TBA) dengan mekanisme reaksi penambahan nukleofilik membentuk senyawa MDA-TBA untuk mendeteksi peroksidasi lipid dalam spesimen biologi. Pada metode ini, MDA yang terbentuk dari hasil peroksidasi lipid akan bereaksi dengan TBA pada suhu tinggi (90-100°C) pada suasana asam.^{16,23,31}

Pengujian TBARS didasarkan pada reaktivitas TBA terhadap MDA yang menghasilkan larutan berwarna merah muda yang merupakan produk dari reaksi 2 mol TBA dengan 1 mol MDA. Kompleks warna yang terbentuk dapat diukur absorbansinya dengan spektrofotometer atau spektrofotometer pada panjang gelombang 532 nm^{16,26} (Gambar 2).



Gambar 2. Senyawa MDA-TBA³⁰

Pengujian malondialdehid dapat dilakukan dengan sampel tanpa antikoagulan maupun dengan antikoagulan. Antikoagulan yang dapat digunakan adalah heparin dan EDTA. Secara umum, darah yang

menggunakan antikoagulan EDTA akan memiliki hasil pengujian MDA lebih rendah dibandingkan dengan darah dengan antikoagulan heparin maupun darah tanpa antikoagulan. Hal ini disebabkan oleh pengikatan besi (Fe) oleh EDTA serta sifat EDTA sebagai antioksidan yang mereduksi aktivitas oksidasi ROS.¹⁶

Metode TBARS merupakan metode yang paling banyak digunakan untuk mengukur peroksidasi lipid dan radikal bebas, sebab metode TBARS cukup sensitif, mudah dikerjakan serta sering digunakan dalam keperluan klinis sehingga dapat merefleksikan kondisi pasien secara klinis pada umumnya.¹⁶

2.5 Rokok Elektrik

Laporan WHO tahun 2009 yang berjudul '*The Global Tobacco Epidemic*' menyebutkan bahwa diperkirakan rokok tembakau turut berkontribusi sebagai penyumbang angka kematian lebih dari 5 juta orang di seluruh dunia setiap tahunnya. Oleh karena itu, untuk mengurangi masalah epidemi tembakau ini, WHO membentuk *WHO Framework Convention on Tobacco Control (WHO-FCTC)* sebagai suatu langkah solutif dalam mengurangi bahaya tembakau dengan menggunakan berbagai metode, salah satunya adalah metode NRT (*Nicotine Replacement Therapy*) merupakan metode yang menggunakan suatu media untuk memberikan nikotin tanpa pembakaran tembakau yang merugikan dimana dalam praktiknya NRT hanya ditujukan sebagai alat bantu dalam program berhenti merokok (*smoking cessation programe*) untuk mencegah *withdrawal effect*

dari nikotin dengan cara menurunkan dosis nikotin secara bertahap. NRT tersedia dalam beberapa macam bentuk, salah satunya adalah rokok elektronik atau *electronic cigarette* atau e-cigs.¹⁰

Rokok elektrik (*electronic cigarette*) atau *rokok elektrik* merupakan salah satu Nicotine RT yang menggunakan listrik dari tenaga baterai untuk memberikan nikotin dalam bentuk uap dan oleh WHO disebut sebagai *Electronic Nicotine Delivery System* (ENDS). Rokok elektrik dirancang untuk memberikan nikotin tanpa pembakaran tembakau dengan tetap memberikan sensasi merokok pada penggunaannya. *Electronic cigarette* diciptakan di Cina lalu dipatenkan tahun 2004 dan dengan cepat menyebar ke seluruh dunia dengan berbagai merek seperti *NJOY*, *EPuffer*, *blu cigs*, *green smoke*, *smoking everywhere*, dan lain-lain. Secara umum sebuah *ecigarette* terdiri dari 3 bagian yaitu: *battery* (bagian yang berisi baterai), *atomizer* (bagian yang akan memanaskan dan menguapkan larutan nikotin) dan *cartridge* (berisi larutan nikotin)^{8,10} (Gambar 3).



Gambar 3. Struktur Rokok Elektrik³²

2.6 Hubungan Inhalasi Cairan Rokok Elektrik Terhadap Kadar

Malondialdehid (MDA)

Aerosol yang dihasilkan dari proses pemanasan dari cairan rokok elektrik menghasilkan senyawa-senyawa radikal bebas. Salah satu marker radikal bebas dalam tubuh adalah malondialdehid (MDA). Malondialdehid (MDA) terbentuk dari peroksidasi lipid pada membran sel, yaitu reaksi antara radikal bebas (radikal hidroksi) dengan *poly unsaturated fatty acid* (PUFA).^{13,25,26}

Penelitian Canistro *et al.* menemukan bahwa paparan rokok elektrik dapat menyebabkan efek toksik yang turut berkontribusi pada kanker. Aerosol cairan rokok elektrik bersifat co-mutagenik dan dapat menginduksi kanker (*cancer-initiating factor*) pada paru-paru tikus. Cairan rokok elektrik memiliki efek *booster* yang kuat terhadap fase 1 bioaktivasi enzim karsinogen seperti aktivasi polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH), nitrosamine, logam, komponen karbonil seperti akrolein dan formaldehid meningkatkan produksi radikal bebas (*reactive oxygen species*) serta oksidasi DNA terhadap *8-hydroxy-2'-deoxyguanosine*. Selain itu, aerosol cairan rokok elektrik dapat merusak DNA tidak hanya pada tingkatan kromosomal di darah perifer seperti merusak formasi untaian leukosit dan mikronukleus di retikulosit, melainkan juga rokok elektrik merusak hingga tingkatan gen seperti *point mutation* pada urin.⁸

Penelitian Muthumalage *et al.* menemukan bahwa aerosol cairan rokok elektrik dapat menyebabkan stres oksidatif yang dapat menginduksi

respon inflamasi di monosit, toksisitas selular serta peningkatan kadar *reactive oxygen species* (ROS) dan berpotensi terhadap toksisitas paru-paru serta kerusakan jaringan pada pengguna rokok elektrik.¹³

Penelitian Shields *et al.* menemukan bahwa jumlah aerosol dan kandungan cairan rokok elektrik dalam aerosol seperti formaldehid, asetaldehid dan akrolein serta induksi sitokin inflamasi akan meningkat sebanding dengan besarnya voltase listrik yang digunakan dalam proses pemanasan.¹⁴

Penelitian Shields *et al.* juga menemukan bahwa terdapat peningkatan makrofag, neutrofil serta limfosit paru pada tikus yang diberi paparan inhalasi rokok elektrik baik dengan nikotin maupun non nikotin. Tikus yang dipapar aerosol rokok elektrik juga didapatkan peningkatan *reactive oxygen species* serta reaktivitas oksidan paru yang dapat meningkatkan sitokin inflamasi seperti IL8 sehingga menyebabkan perubahan pada fibroblast paru dimana jika berlangsung secara terus menerus dapat menyebabkan penyakit paru obstruktif kronis (PPOK).¹⁴

Terdapat beberapa faktor yang berpotensi meningkatkan kadar radikal bebas yang diindikasikan melalui peningkatan kadar malondialdehid seperti:

a) Aktivitas fisik

Aktivitas fisik adalah pergerakan tubuh karena adanya kontraksi otot yang berakibat pada peningkatan pengeluaran energi. Aktivitas fisik

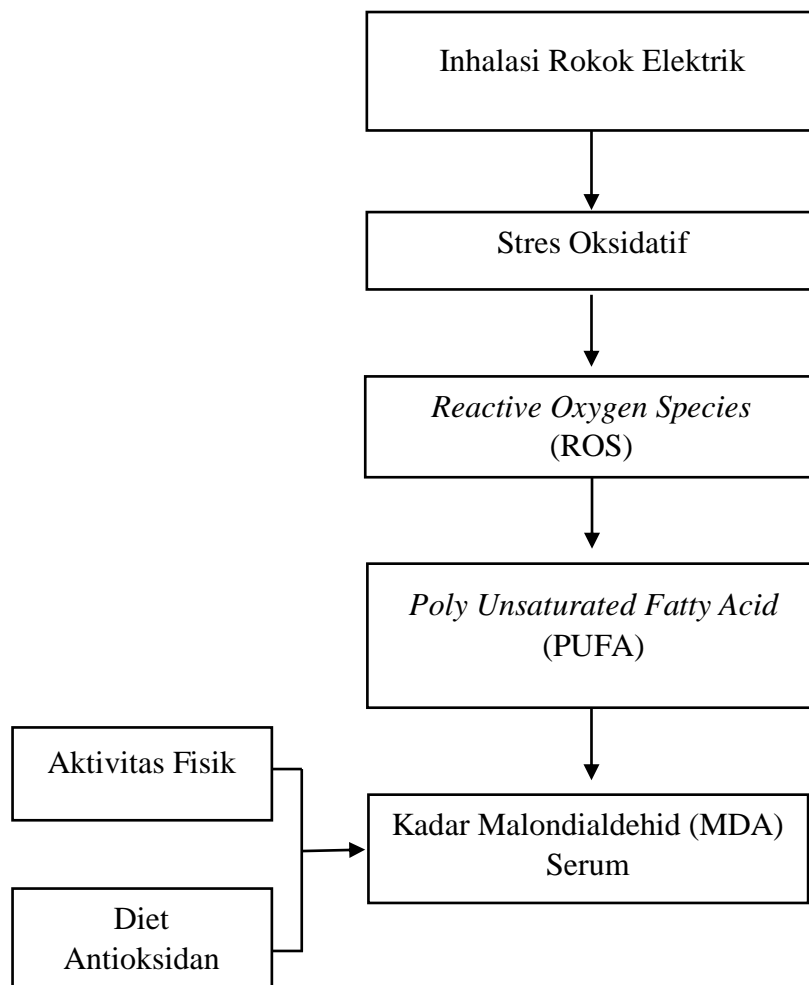
meliputi aktivitas fisik di tempat kerja, aktivitas fisik dalam perjalanan, aktivitas fisik di rumah maupun aktivitas di waktu luang dapat digolongkan sebagai aktivitas sehari – hari secara umum. Aktivitas fisik juga dapat berupa *exercise* yaitu latihan fisik baik yang termasuk maupun tidak termasuk cabang olahraga tertentu. *Exercise* merupakan pergerakan tubuh yang terstruktur, terencana dan teratur yang melibatkan komponen fisik, psikis serta membutuhkan keterampilan. Pengaruh aktivitas fisik terhadap stres oksidatif terbagi atas respon akut dan respon kronik. Aktivitas fisik secara akut dapat meningkatkan pembentukan radikal bebas sehingga meningkatkan stres oksidatif dalam tubuh. Aktivitas fisik secara kronik (teratur) dapat meningkatkan kapasitas antioksidan endogen, sehingga menurunkan stres oksidatif dalam tubuh.^{33,34}

b) Diet antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat melindungi sistem biologis dalam tubuh. Kekurangan antioksidan menyebabkan perlindungan terhadap radikal bebas menjadi lemah. Salah satu antioksidan tubuh adalah vitamin E. Vitamin E mengandung *tocopherol* yang bertindak sebagai antioksidan pemutus rantai pada membran yang efektif untuk menurunkan kadar kreatin kinase yang merupakan salah satu kadar indikator stress oksidatif pada kerusakan otot dan juga dapat menurunkan kadar malondialdehid, menurunkan kerusakan DNA serta dapat menurunkan produksi *pentane* dan produk peroksidasi lipid dari mitokondria.³⁵

2.7 Kerangka Teori

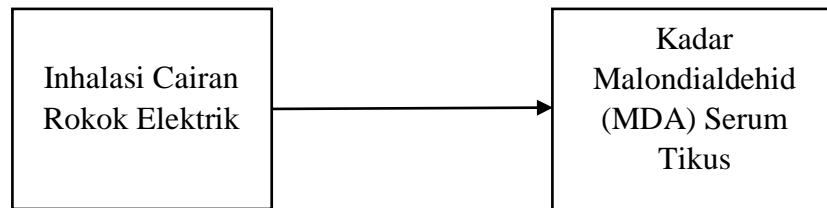
Berdasarkan tinjauan pustaka di atas, dapat digambarkan kerangka teori sebagai berikut:



Gambar 4. Kerangka Teori

2.8 Kerangka Konsep

Berdasarkan kerangka teori di atas, dapat disusun kerangka konsep sebagai berikut:



Gambar 5. Kerangka Konsep

2.9 Hipotesis

2.9.1 Hipotesis Mayor

Terdapat peningkatan kadar MDA dalam serum wistar setelah inhalasi cairan rokok elektik.

2.9.2 Hipotesis Minor

- a. Terdapat peningkatan kadar MDA serum kelompok tikus setelah inhalasi cairan rokok elektrik nikotin terhadap kadar MDA serum dibandingkan kadar MDA serum tikus yang diberi perlakuan normal.
- b. Terdapat peningkatan kadar MDA serum kelompok tikus setelah inhalasi cairan rokok elektrik non nikotin terhadap kadar MDA serum tikus yang diberi perlakuan normal.
- c. Kadar MDA serum kelompok tikus yang diberi inhalasi cairan rokok elektrik nikotin paling tinggi dibandingkan

daripada kelompok tikus yang diberi inhalasi cairan rokok non nikotin dan kelompok tikus perlakuan normal.