

**HUBUNGAN POLIMORFISME GENETIK CYP2A6 DAN
METABOLISME NIKOTIN DENGAN STRES OKSIDATIF,
INFLAMASI VASKULER, DAN PERUBAHAN MATRIKS
EKSTRASELULER PADA PENDERITA PENYAKIT JANTUNG
KORONER**

***THE RELATION OF CYP 2A6 GENETIC POLYMORPHISM
AND NICOTINE METABOLISM WITH OXIDATIVE STRESS,
VASCULAR INFLAMMATION, AND EXTRACELLULAR
MATRIX REMODELING IN CARDIOVASCULAR DISEASE
PATIENTS***

DEWI MULIATY



**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2010

Daftar Tim Penguji

1. Prof. dr. Irawan Yusuf, Ph.D (Ketua/Promotor)
2. Prof. Dr.dr. Rianto Setiabudy, SpFK (Anggota/Promotor)
3. Dr. dr. Septelia Inawati Wanandi (Anggota/Promotor)
4. Prof. Dr. dr. Ali Aspar, SpPD., SpJP (Anggota/Penguji)
5. Prof. Dr. dr. Suryani As'ad, M.Sc (Anggota/Penguji)
6. Dr. dr. Ilhamjaya Patellongi, M.Kes (Anggota/Penguji)
7. Prof. Dr.dr. F.X. Budhianto Suhadi, SpPK (K).,MM (Anggota/Penguji)

**HUBUNGAN POLIMORFISME GENETIK CYP2A6 DAN
METABOLISME NIKOTIN DENGAN STRES OKSIDATIF,
INFLAMASI VASKULER, DAN PERUBAHAN MATRIKS
EKSTRASELULER PADA PENDERITA
PENYAKIT JANTUNG KORONER**

Disertasi

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Doktor

Program Studi
Ilmu Kedokteran

Disusun dan diajukan oleh

DEWI MULIATY
Nomor Pokok P0200306008

kepada

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2010**

DISERTASI

HUBUNGAN POLIMORFISME GENETIK CYP2A6 DAN METABOLISME NIKOTIN DENGAN STRES OKSIDATIF, INFLAMASI VASKULER, DAN PERUBAHAN MATRIKS EKSTRASELULER PADA PENDERITA PENYAKIT JANTUNG KORONER

Disusun dan diajukan oleh

DEWI MULIATY

Nomor Pokok P0200306008

Telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Disertasi
pada tanggal 30 November 2010
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui,

Komisi Penasihat,

Prof. dr. Irawan Yusuf Ph.D.

Promotor

Prof. Dr. dr. Rianto Setiabudy SpFK

Kopromotor

Ketua Program Studi Kedokteran

Dr. dr. Septelia Inawati Wanandi

Kopromotor

Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Hasanuddin

Prof. Dr. dr. Suryani As'ad, MSc

Prof. dr. Irawan Yusuf Ph.D.

PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Dewi Muliaty
Nomor Mahasiswa : P0200306008
Program studi : Ilmu Kedokteran

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan disertasi ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 30 November 2010

Yang menyatakan

Dewi Muliaty

PRAKATA

Segala puji, hormat dan syukur penulis panjatkan ke hadapan Allah Yang Maha Kasih, atas segala berkat dan karuniaNya penulis dapat menyelesaikan disertasi ini.

Penelitian ini dilatar belakangi oleh kebiasaan merokok yang sulit ditinggalkan oleh pecandunya sekali pun dapat menimbulkan berbagai penyakit yang merugikan, dan mengakibatkan beban biaya kesehatan masyarakat yang tinggi. Penulis bermaksud menyumbangkan konsep yang dapat dimanfaatkan untuk memberikan peringatan individual, dan prediksi pada penyakit jantung koroner, sehingga perokok diharapkan berkeinginan untuk menghindari rokok setelah mengetahui risiko penyakit yang akan menyertai, terutama penyakit jantung koroner yang diteliti oleh penulis.

Berbagai tantangan dan pengalaman berharga telah penulis hadapi dalam rangka penyusunan disertasi ini. Dan berkat bantuan berbagai pihak maka penelitian ini dapat diselesaikan dan dituangkan di dalam disertasi ini. Dalam kesempatan ini penulis dengan tulus dan rasa hormat ingin menyampaikan terima kasih sebesar-besarnya kepada:

Prof. dr. Irawan Yusuf Ph.D. sebagai Promotor sekaligus Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin atas bimbingan, arahan, dan petunjuk yang sangat berguna mulai dari membuka wawasan dan minat terhadap permasalahan penelitian, pelaksanaan penelitian, proses mengatasi hambatan (*problem solving*), sampai dengan penyusunan disertasi ini.

Prof. DR. dr. Rianto Setiabudy SpFK dan **Dr. dr. Septelia Inawati Wanandi** sebagai Kopromotor atas bimbingan, arahan dan petunjuk yang sangat berguna di dalam sistematika berpikir, alur penelitian, arah dan hipotesis penelitian, pelaksanaan penelitian, sampai dengan penyusunan disertasi ini.

Miki Nakajima PhD, Associate Professor Drug Metabolism and Toxicology – Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University, Japan, yang telah memberi kesempatan untuk melakukan pemeriksaan konsentrasi nikotin dan kotinin plasma di Laboratorium Drug Metabolism and Toxicology – Kanazawa University, Jepang, serta mengarahkan dan membimbing pelaksanaan pemeriksaan polimorfisme genotipe CYP2A6 yang dilakukan di laboratorium biomolekuler Prodia Jakarta.

Ucapan terima kasih dan hormat penulis sampaikan pula kepada:

Prof. Dr. dr. Idrus Paturusi, Rektor Universitas Hasanuddin, **Prof. Dr. Ir. Mursalim** Direktur Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin, dan **Prof. Suryani As'ad MSc**, Ketua Program Studi Kedokteran sekaligus sebagai penguji, yang telah memberikan kesempatan terbukanya program pendidikan Pascasarjana S3 bidang studi ilmu kedokteran bagi kami yang bekerja di PT. Prodia Widyahusada.

Bapak Drs. Andi Wijaya Ph.D., dan **Ibu Dra. Endang Hoyaranda**, Komisaris Utama dan Presiden Group dari PT.Prodia Widyahusada yang telah banyak mendukung dan memberi kesempatan, semangat dan dorongan serta fasilitas dalam rangka melakukan penelitian ini. Kepada

Pak Andi terima kasih atas kiriman pustaka baru yang terus mengalir terkait penelitian penulis, juga dorongan semangat dan teladan kedisiplinan tinggi dalam menggali ilmu.

Prof. Dr. dr. F.X. Budhianto Suhadi sebagai penguji yang memberikan saran dan semangat kepada penulis, serta **Dr. dr. Ilhamjaya Patellongi MS** sebagai penguji yang telah memberikan saran, petunjuk dan ide-ide analisis statistik berdasarkan kerangka konsep penelitian ini.

Dr. Idar Mappangara SpJP yang sangat membantu dan mendukung penulis di dalam memperoleh sampel penelitian dari penderita penyakit jantung koroner di Poliklinik jantung RS. Wahidin Sudirohusodo, demikian juga kepada Bapak **Drs. Agus Sulaeman MSi. beserta seluruh staf** Laboratorium Prodia Makassar yang telah membantu kelancaran penelitian penulis sampai selesainya penyusunan disertasi ini. Kepada Bapak **Miswar Fattah MSi., Ibu Wiwik Rositawati Msi., Reny Mulatsih SSi. beserta seluruh staf** Laboratorium Riset Prodia Pusat Jakarta yang telah membantu terlaksananya pengambilan dan pengumpulan sampel, pengerjaan pemeriksaan penelitian, serta pengumpulan dan pengolahan data penelitian.

Kepada Bapak-Bapak Komisaris PT. Prodia Widyahusada, **Bapak Elias Nugroho, Bapak Hamdono Widjojo, Bapak Gunawan PS dan Bapak Ichsan Hidayat** beserta para **Direksi dan Kepala Wilayah** dan seluruh jajarannya, penulis mengucapkan terima kasih banyak atas doa, dukungan moral dan waktu yang diberikan selama menjalankan

pendidikan pascasarjana di Universitas Hasanuddin. Demikian juga kepada **Merry Christina**, sekretaris yang mendampingi penulis di dalam menyusun dan mempersiapkan disertasi ini.

Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada mereka yang namanya tidak tercantum tetapi telah banyak membantu penulis dalam menyelesaikan disertasi ini. Semoga berkat Tuhan melimpah bagi semua pihak yang telah membantu penyelesaian disertasi ini.

Akhirnya ucapan terima kasih yang tak terhingga kepada pendamping setia, suami Djuliam Liusvia dan anak-anakku Pascal dan Johan yang senantiasa memberikan dukungan dan semangat di dalam menjalani pendidikan, penelitian, dan penyusunan disertasi ini. Kepada Papa Gozali Rahardja dan seluruh keluarga besar penulis mengucapkan terima kasih atas doa dan dukungannya selama menjalankan pendidikan ini. Semoga waktu yang telah terambil dari kebersamaan kita selama pendidikan ini dapat memberikan makna bagi orang banyak khususnya di bidang kesehatan.

Makassar, 30 November 2010

Dewi Muliaty

ABSTRAK

DEWI MULIATY. Hubungan polimorfisme genetik CYP2A6 dan metabolisme nikotin dengan stres oksidatif, inflamasi vaskuler, dan perubahan matriks ekstraseluler pada penderita penyakit jantung koroner (dibimbing oleh Irawan Yusuf, Rianto Setiabudy, dan Septelia Inawati Wanandi).

Polimorfisme genetik CYP2A6 berkaitan dengan metabolisme nikotin, yang merupakan suatu modulator adiksi nikotin dan perilaku merokok. Merokok telah diketahui berperan pada proses terjadinya aterosklerosis dan penyakit vaskuler. Nikotin dan komponen toksin yang terkandung di dalam asap rokok banyak diteliti dalam kaitannya dengan penyakit akibat merokok, dan radikal bebas asap rokok dikaitkan dengan timbulnya stres oksidatif, inflamasi vaskuler dan disfungsi endotel dimana terjadi perubahan matriks ekstraseluler.

Tujuan penelitian ini untuk menilai hubungan polimorfisme genetik CYP2A6 dan metabolisme nikotin dengan biomarker risiko penyakit jantung koroner (PJK) terkait stres oksidatif (F2-Isoprostan), inflamasi vaskuler (hs-CRP), dan perubahan matriks ekstraseluler (MMP-9) pada penderita PJK.

Metode penelitian yang digunakan adalah observasional dengan rancangan potong lintang. Analisis dilakukan terhadap 94 subyek pria penderita PJK yang direkrut dari poliklinik kardiologi Rumah Sakit Dr. Wahidin Sudirohusodo Makassar. Penetapan alel gen CYP2A6 (CYP2A6*1A, CYP2A6*1B, CYP2A6*4A, CYP2A6*7, CYP2A6*8, CYP2A6*9 and CYP2A6*10) dilakukan dengan teknik *polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP), dan *allele specific-polymerase chain reaction*-PCR (AS-PCR). Penetapan konsentrasi nikotin dan kotinin dilakukan dengan metode *high-performance liquid chromatography* (HPLC). Pengukuran konsentrasi serum biomarker F2-Isoprostan, dan MMP-9 dilakukan dengan metode ELISA, pemeriksaan hs-CRP dilakukan dengan metode imunokemiluminometrik.

Hasil penelitian ini menunjukkan polimorfisme genetik CYP2A6 berkorelasi dengan metabolisme nikotin ($p=0,046$), metabolisme nikotin (rasio kotinin/nikotin) berkorelasi dengan status merokok penderita PJK ($p<0,01$), dan berhubungan dengan konsentrasi hs-CRP serum ($p=0,005$) serta MMP-9 serum ($p=0,025$). Intensitas merokok tidak berkaitan dengan metabolisme nikotin maupun konsentrasi berbagai biomarker risiko PJK ($p>0,05$). Genotipe CYP2A6 dengan alel *1B dan *1A memberikan gambaran metabolisme nikotin paling cepat. Penderita PJK perokok dengan genotipe CYP2A6*1B/*1B dan *1B/*4A memiliki kadar hs-CRP lebih tinggi dibandingkan dengan penderita PJK yang tidak merokok ($p<0,05$). Penderita PJK perokok dengan genotipe CYP2A6*1A/*1B memiliki konsentrasi MMP-9 serum lebih tinggi dibandingkan dengan penderita PJK yang tidak merokok ($p=0,027$)

Kesimpulan penelitian: genotipe CYP2A6 dengan alel gen *wild type* *1A dan *1B memiliki metabolisme nikotin paling cepat, dan pada penderita PJK perokok dapat meningkatkan risiko inflamasi vaskuler dan perubahan matriks ekstraseluler yang berisiko pada keoyakan plak aterosklerosis.

ABSTRACT

DEWI MULIATY. *The relation of CYP2A6 genetic polymorphism and nicotine metabolism with oxidative stress, vascular inflammation, and extracellular matrix remodeling in cardiovascular disease patients* (supervised by Irawan Yusuf, Rianto Setiabudy, and Septelia Inawati Wanandi).

Genetic polymorphism of CYP2A6 is associated with the metabolism of nicotine, and is a possible modulator of nicotine addiction and smoking behavior. Cigarette smoking has been known in contributing to the pathogenesis of atherosclerosis and vascular diseases. Nicotine and toxic components of cigarette smoke have been studied in smoking related diseases, furthermore free radicals from cigarette smoke may increase oxidative stress, vascular inflammation and endothelial dysfunction with the implication of remodeling in extracellular matrix.

The aim of this study was to observe the relation of CYP2A6 genetic polymorphism and nicotine metabolism with cardiovascular disease (CVD) risk biomarkers through oxidative stress (F2-Isoprostane), vascular inflammation (hs-CRP), and extracellular matrix remodeling (MMP-9) in CVD's patients.

The method of this study was the observational study with cross-sectional design. Ninety-four male subjects with CVD were recruited from cardiology center of Dr. Wahidin Sudirohusodo Hospital, Makassar. The alleles of CYP2A6 gene (CYP2A6*1A, CYP2A6*1B, CYP2A6*4A, CYP2A6*7, CYP2A6*8, CYP2A6*9 and CYP2A6*10) from the subjects were genotyped by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), and allele specific-polymerase chain reaction (AS-PCR). Nicotine and cotinine serum level were measured by *high-performance liquid chromatography* (HPLC). Serum levels of F2-isoprostane and MMP-9 were measured by ELISA method, while hs-CRP test performed by Immunochemiluminometric assay.

The results showed CYP2A6 genetic polymorphism correlated with nicotine metabolism ($p=0.046$), nicotine metabolism (cotinine/nicotine ratio) correlated with smoking status of CVD patients ($p<0.01$) and related to serum level of hs-CRP ($p=0.005$) and MMP-9 ($p=0.025$). The number of cigarettes smoked did not correlate with serum levels of all CVD risk biomarkers ($p>0.05$). The CYP2A6 genotype with *1B and *1A alleles had the highest nicotine metabolic index (cotinine/nicotine ratio). Serum levels of hs-CRP in smoking CVD patients with CYP2A6*1B/*1B and *1B/*4A genotypes were higher than those of the non smokers ($p<0.05$). The mean serum level of MMP-9 in smoking CVD patients with CYP2A6*1A/*1B genotype was higher than those of the non smokers ($p=0.027$).

The conclusions from this study were CYP2A6 genotype with *1A and *1B alleles had the highest nicotine metabolic index, and increased the risk of vascular inflammation and extracellular matrix remodeling in smoking CVD patients.

DAFTAR ISI

	halaman
PRAKATA	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN	xiii
I. PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	5
C. Tujuan Penelitian	6
D. Manfaat Penelitian	7
E. Ruang Lingkup / Batasan penelitian	8
II. TINJAUAN PUSTAKA/KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS PENELITIAN, DAN VARIABEL PENELITIAN	
A. TINJAUAN PUSTAKA / KERANGKA TEORI	9 / 29
1. Sifat fisika dan biokimia rokok	9
2. Metabolisme nikotin dan polimorfisme genetik CYP2A6	11

2.1. Polimorfisme genetik CYP2A6	13
2.2. Frekuensi alel gen CYP2A6	18
3. Implikasi polimorfisme genetik CYP2A6 pada Kebiasaan merokok	18
4. Merokok dan penyakit vaskular aterosklerotik	20
4.1. F2-Isoprostan pada perokok dan PJK	22
4.2. <i>C-reactive protein</i> (CRP) pada perokok dan PJK	24
4.3. <i>Matrix Metalloproteinase</i> (MMP) pada perokok dan PJK	26
4.4. Kebiasaan merokok dan risiko PJK	28
B. KERANGKA KONSEP	30
C. VARIABEL PENELITIAN	30
D. HIPOTESIS PENELITIAN	31
III. METODE PENELITIAN	
A. Rancangan Penelitian	32
B. Populasi Penelitian	32
C. Subyek Penelitian	33
D. Tempat dan Waktu Penelitian	33
E. Perkiraan Besar Sampel	34
F. Metode Pengambilan Sampel	36
G. Metode Pengumpulan Data	37
H. Etika	38
I. Informed Consent	38

J. Cara Pemeriksaan dan Kriteria Obyektif	38
K. Metode Analysis Data	51
L. Alur Penelitian	52
IV. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	
A. Gambaran Umum Hasil Penelitian	54
B. Frekuensi alel gen dan genotipe CYP2A6 pada populasi Indonesia yang tinggal di Makassar dan Jakarta	55
C. Hubungan polimorfisme genetik CYP2A6 (genotipe) Terhadap fenotipe metabolisme nikotin	65
D. Pengaruh polimorfisme genetik CYP2A6 dan fenotipe Metabolisme nikotin terhadap konsumsi rokok penderita PJK	72
E. Perbedaan konsentrasi F2-Isoprostan serum diantara Polimorfisme genetik CYP2A6 pada penderita PJK	76
F. Perbedaan konsentrasi hs-CRP serum diantara polimorfisme Genetik CYP2A6 pada penderita PJK	80
G. Perbedaan konsentrasi MMP-9 serum diantara polimorfisme Genetik CYP2A6 pada penderita PJK	82
H. Analisa hubungan polimorfisme genetik CYP2A6, dengan F2-Isoprostan, hs-CRP dan MMP-9 melalui pengaruh metabolisme nikotin dan konsumsi rokok pada penderita PJK	85
I. Ringkasan	88

J. Keterbatasan Penelitian	92
V. PENUTUP	
A. Kesimpulan	94
B. Saran	95
DAFTAR PUSTAKA	96
LAMPIRAN	105

DAFTAR TABEL

No. Tabel		halaman
2.1.	Alel CYP2A6 dan efek polimorfisme yang ditimbulkan Pada aktivitas enzim	15
2.2	Frekuensi alel gen CYP2A6 pada berbagai populasi di Asia	18
4.1	Karakteristik klinis dan biokimia subyek penelitian	55
4.2	Frekuensi alel gen CYP2A6 pada populasi sehat orang Indonesia pada penderita PJK	56
4.3	Frekuensi alel gen CYP2A6 hasil penelitian pada populasi Indonesia yang tinggal di Makassar dan Jakarta dibandingkan dengan populasi asia lainnya	57
4.4	Frekuensi genotipe CYP2A6 pada populasi sehat orang Indonesia dan pada penderita PJK	58
4.5	Rasio konsentrasi kotinin/nikotin plasma pada subyek sehat dan penderita PJK berdasarkan genotipenya	69
4.6	Frekuensi allel gen CYP2A6 pada penderita PJK bukan Perokok, mantan perokok dan perokok dibandingkan dengan Frekuensi pada subyek sehat	73
4.7	Genotipe CYP2A6 dan konsumsi jumlah rokok pada PJK Perokok	74
4.8	Rasio kotinin/nikotin plasma pada penderita PJK perokok, Mantan perokok dan bukan perokok berdasarkan Kelompok Alel gen CYP2A6	76
4.9	Perbedaan rerata konsentrasi F2-Isoprostan, hs-CRP, Dan MMP-9 serum pada kelompok PJK perokok, mantan Perokok dan bukan perokok	77
4.10	Konsentrasi F2-Isoprostan serum pada kelompok alel CYP2A6*1 (<i>wild type</i> *1A, dan 1B) dan kelompok alel	78
4.11	Konsentrasi F2-Isoprostan, hs-CRP, dan MMP-9 Berdasarkan jumlah konsumsi rokok pada kelompok PJK perokok	80

- 4.12 Konsentrasi hs-CRP serum pada kelompok alel CYP2A6*1
(wild type*1A, dan 1B) dan kelompok alel 82
- 4.13 Konsentrasi MMP-9 serum pada kelompok alel CYP2A6*1
(wild type*1A, dan *1B) dan kelompok alel 84

DAFTAR GAMBAR

No. Gambar	Halaman
2.1. Skema Kuantitatif dari metabolisme nikotin (Hukkanen 2005)	13
2.2. Susunan gen CYP2A6 dan polimorfismenya	16
2.3. Peranan CRP dalam Proses inflamasi dan aktivasi endotel (Szmítko, 2003)	25
2.4. Peranan MMP-9 mulai dari progresi sampai dengan Destabilisasi Plak aterosklerosis	27
4.1. Produk PCR pada penetapan genotipe alel CYP2A6*1A, CYP2A6*1B, CYP2A6*4A (Metode Fukami et al, 2008)	62
4.2. Hasil Elektroforesis RFLP (restriction fragment length polymorphism) untuk penetapan genotipe alel	63
4.3. Hasil penetapan genotipe alel CYP2A6*7 dengan allele spesifik (AS)-PCR (Yoshida <i>et al</i> , 2002)	63
4.4. Hasil penetapan genotipe alel CYP2A6*8 dengan allele spesifik (AS)-PCR (Yoshida <i>et al</i> , 2002)	64
4.5. Hasil penetapan genotipe alel CYP2A6*9 dengan Allele spesifik (AS)-PCR (Metode Nakajima <i>et al</i> , 2006)	64
4.6. Frekuensi (jumlah) genotipe CYP2A6 mutan Pada populasi sehat dan penderita PJK	65
4.7. Rerata rasio Kotinin/nikotin plasma pada kelompok genotipe CYP2A6*1, CYP2A6*9, CYP2A6*4A	71
4.8. Diagram hubungan polimorfisme genetik CYP2A6, Metabolisme Nikotin dan konsumsi rokok/status perokok, mantan perokok, dan bukan perokok, dengan F2-Isoprostan, hs-CRP, dan MMP-9 pada penderita PJK	85
4.9. Distribusi genotipe CYP2A6 pada penderita PJK (P), mantan perokok (MP), dan bukan perokok (BP) pada konsentrasi biomarker dibawah nilai cut off dan di atas nilai cut off	90

DAFTAR LAMPIRAN

nomor	halaman
1. Tabel Konsentrasi Nikotin, Kotinin, dan Rasio Kotinin/ Nikotin pada subyek sehat, penderita PJK dan total subyek penelitian	105
2. Tabel Rasio konsentrasi kotinin/nikotin plasma pada populasi Indonesia yang tinggal di Makassar dan Jakarta dibandingkan dengan populasi Jepang dan Korea	106
3. Tabel Rasio kotinin/nikotin plasma kelompok genotipe CYP2A6 pada penderita PJK bukan perokok, mantan perokok dan perokok	107
4. Tabel Konsentrasi Biomarkers pada PJK bukan Perokok, PJK Mantan Perokok dan PJK Perokok menurut Genotipe CYP2A6	108
5. Tabel Analisis regresi logistik ganda dan ordinal logistik antara variabel tergantung stres oksidatif (F2-Isoprostan), inflamasi vaskuler (hs-CRP), dan perubahan matriks ekstraseluler/disfungsi endotel (MMP-9), dengan polimorfisme genetik CYP2A6, fenotipe metabolisme nikotin (rasio kotinin/nikotin), konsumsi rokok (ringan-sedang-berat), PJK perokok- mantan perokok-bukan perokok (P-MP-BP).	109
6. Tabel Analisis regresi logistik ganda dan logistik ordinal antara polimorfisme genetik CYP2A6 dengan metabolisme nikotin (rasio kotinin/nikotin); Rasio kotinin/nikotin dengan konsumsi rokok (ringan-sedang-berat); Rasio kotinin/nikotin dengan PJK perokok-mantan perokok-bukan perokok (P-MP-BP).	110
7. Tabel Analisis logistik ordinal antara polimorfisme genetik CYP2A6, rasio kotinin/nikotin, konsumsi rokok (ringan-sedang-berat) dan PJK perokok-mantan perokok-bukan perokok (P-MP-BP), dengan gabungan biomarker PJK (F2-Isoprostan, hs-CRP, dan MMP-9 di bawah dan di atas nilai cut off/median)	111

8. Rekomendasi Persetujuan Etik	112
9. Alat dan bahan yang dipakai pada penelitian	113
10. Tabel Primer yang digunakan untuk pendeteksi alel CYP2A6	115
11. Naskah penjelasan untuk responden (subyek)	116
12. Formulir persetujuan mengikuti penelitian setelah mendapat penjelasan	118
13. Form kuesioner penelitian farmakogenetik pada PJK	119
14. Lembar permintaan Pemeriksaan	123

DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN

Lambang/singkatan	Arti dan Keterangan
8- <i>epi</i> -PGF ₂	8- <i>epi</i> -prostaglandin F ₂ atau F ₂ -isoprostan
AS-PCR	Allele specific – polymerase chain reaction
BHT	Butil hidroksitoluen (pengawet sampel)
BP	Bukan perokok
CI	Confidence interval
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
CSE	Cigarette smoke extract
CYP	Cytochrome P450
dL	desiliter
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	deoxyribonucleotide triphosphates
EDV	Endothelium-dependent vasodilatation
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
g	Gram
HCl	asam hidroklorida
HPLC	High performance liquid chromatography
HRP	horseradish peroxidase
hs-CRP	high-sensitivity C-reactive protein
IL	Interleukin
IMT	Indeks masa tubuh
JNC-VII	Joint National Committee - VII

K/DOQI	Kidney disease outcomes quality initiative
Kb	Kilo base
Kg	Kilogram
KOH	Kalium hidroksida
LDL	Low-density lipoprotein
M	Molar
m/m	mutan/mutan
mg	Miligram
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnesium klorida
mL	Milliliter
mm	Milimeter
mM	miliMolar
MMP	Matrix metalloproteinase
MP	Mantan perokok
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide Phosphate
NaOH	Natrium hidroksida
Ng	Nanogram
NO	Nitric oxide
NOS	Nitric oxide synthase
OR	odds ratio
P	Perokok

PCR	Polymerase chain reaction
PJK	Penyakit Jantung Koroner
RFLP	Restrictionfragment length polymorphism
ROS	Reactive oxigen species
RSD	Relative Standard Deviation
SGOT	serum glutamic oxalacetic transaminase
SGPT	serum glutamic piruvate transaminase
sICAM	soluble Intercellular adhesion molecule
SNP	Single nucleotide polymorphism
SPSS	Statistical package for the social sciences
TDD	Tekanan darah diastole
TDS	Tekanan darah sistol
TGF- β	Transforming growth factor - β
TIMP	Tissue inhibitors of metalloproteinase
TMB	Tri-mode buffer
TNF	Tumor necrosis factor
TPP	Tiamin pirofosfat (pengawet sampel)
U/L	Unit per liter
UTR	Untranslated region
UV	ultra violet
w/m	wild type/mutan
w/w	wild type/wild type
μ L	Mikroliter

µm	Mikrometer
G479V	Glycine pada posisi 479 digantikan dengan Valine
R128Q	Arginine pada posisi 128 digantikan dengan Glutamine
I471T	Isoleucine pada posisi 471 digantikan dengan Threonine
R485L	Arginine pada posisi 485 digantikan dengan Leucine
T160H	Threonine pada posisi 160 digantikan dengan Histidine
S224P	Serine pada posisi 224 digantikan dengan Proline
S29N	Serine pada posisi 29 digantikan dengan Asparagine
R203S	Arginine pada posisi 203 digantikan dengan Serine
V365M	Valine pada posisi 365 digantikan dengan Methionine
Y392F	Tyrosine pada posisi 392 digantikan dengan phenylalanine

BIODATA PENELITI

A. DATA PRIBADI

Nama : Dewi Muliaty
Tempat /Tanggal lahir : Jakarta, 17 Mei 1963
Pekerjaan : Laboratorium Klinik Prodia
Alamat kantor : Jl. Kramat Raya 150, Jakarta
Pangkat : Direktur Utama
Alamat rumah : Perumahan Jatinegara Baru
Jl.Gn.Merbabu 23 Jakarta 13940

B. RIWAYAT PENDIDIKAN

1968 – 1973 : SDN Kaum Pandak – Bogor
1974 – 1976 : SMPK Tunas Harapan Jakarta
1977 – 1979 : SMF Tunas Bangsa Jakarta
1982 – 1987 : S1 Farmasi Univ. Padjajaran Bandung
1987 – 1988 : Profesi Apoteker Univ. Padjajaran Bdg
2004 – 2006 : S2 Kimia Klinik FK Univ. Hassanudin

C. RIWAYAT PEKERJAAN

1988 – 1990 : Asisten Manajer Teknis / TQC
Laboratorium Klinik Prodia Pusat
1991 – 1993 : Manajer Teksnis / QC
Laboratorium Klinik Prodia Pusat
1994 – 2002 : Manajer Penelitian dan Pengembangan
Laboratorium Klinik Prodia
2003 – 2009 : Direktur Pengembangan
2009 – Sekarang : Direktur Utama

D. PESERTA PADA PELATIHAN

1995 : Royal College Pathologist of Australasia :
Chemical Pathology Course, Australia
Association of Clinical Biochemistry (Australia)
1996 – 2009 : AACC course and workshop ; American
Association of Clinical Chemistry (Amerika)

E. PUBLIKASI PENELITIAN

- 2000 : Variability in Positivity rate of IgG anti-H.pylori among provinces in Indonesia - *The 3rd Western Pacific Helicobacter Congress. Bali Journal of Gastroenterology and Hepatology 2000;15:H4*
- 2000 : Determination of CMV IgG Avidity in IgM tested Samples - *5th Asia Pacific Congress of Virology. Bali.*
- 2007 : Lipopolysaccharide Binding Protein (LBP), Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) and Activated Protein C and Clinical Outcome in Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) and Sepsis - *11th Asian and Pacific Congress of Clinical Biochemist. Beijing*
- 2008 : Sources of Variation of Commonly Measured Serum Analytes in 6 Asian Cities and Consideration of Common Reference Intervals - *Clinical Chemistry 2008: 54:356-365*
- 2009 : Relationship between Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance and Atherosclerosis Markers in Cigarette Smoking - *The Third International Congress on Prediabetes and the Metabolic Syndrome*
- 2010 : CYP2A6 gene polymorphisms impact to nicotine metabolism - *Medical Journal of Indonesia 2010;1:46-51*

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Kematian akibat penyakit jantung koroner (PJK) pada perokok di dunia mencapai sekitar 1,69 juta jiwa, atau 11% dari total kematian akibat PJK pada tahun 2000. Dari suatu studi kasus-kontrol secara multisenter tentang kejadian infark miokard yang pertama kali dialami, ditemukan bahwa merokok memberikan kontribusi 36% dari populasi yang berisiko, dan risiko ini meningkat sejalan dengan peningkatan jumlah perokok (Perlstein, 2006).

Merokok merupakan faktor risiko utama pada PJK, dikaitkan dengan gangguan vasodilatasi endotelium (*endothelium-dependent vasodilation/EDV*) pada pembuluh darah, gangguan trombolisis/fibrinolisis, modifikasi profil lemak (Ambrose, 2004), *vascular remodeling* dan ketidakstabilan plak aterosklerosis (Perlstein, 2006).

Merokok berpengaruh pada semua tahapan terjadinya aterosklerosis, mulai dari disfungsi endotel sampai timbulnya gejala klinis akut. Komponen toksik rokok secara pasti dan mekanismenya yang terkait dengan PJK belum jelas diketahui, namun beberapa fakta menunjukkan bahwa merokok dapat meningkatkan inflamasi, stres oksidatif, trombolisis, dan oksidasi *low-density lipoprotein (LDL) cholesterol* (Ambrose, 2004).

Nikotin adalah senyawa utama di dalam tembakau yang menimbulkan ketergantungan pada rokok. Nikotin diinaktivasi oleh tubuh menjadi kotinin melalui kerja enzim CYP2A6. Dari beberapa penelitian ditemukan bahwa polimorfisme genetik CYP2A6 memegang peranan penting di dalam ketergantungan pada nikotin dan mempengaruhi perilaku merokok. Telah diketahui terdapat alel gen CYP2A6*1A (*wild type / normal*) yang berhubungan dengan metabolisme nikotin normal/ekstensif, sedangkan beberapa alel gen yang mengalami mutasi seperti alel CYP2A6*4, CYP2A6*7, CYP2A6*8, CYP2A6*9, dan CYP2A6*10, berkaitan dengan penurunan aktivitas metabolisme nikotin. Variasi aktivitas metabolisme ini berpengaruh pada konsentrasi nikotin plasma. Perokok memerlukan kadar nikotin tertentu pada otaknya, sehingga pada metabolisme nikotin yang ekstensif diperlukan jumlah rokok yang lebih banyak. Sedangkan pada metabolisme yang lambat, nikotin plasma lambat diinaktivasi dan akan mengakibatkan gejala intoksikasi, sehingga ketergantungan pada rokok menjadi lebih rendah. (Malaiyandi, 2005; Nakajima, 2004; Yamanaka, 2004). Gen CYP2A6 di Indonesia yang mempengaruhi aktivitas metabolisme nikotin sampai saat ini belum diketahui variasi alel dan frekuensinya.

Di dalam rokok terkandung pula berbagai senyawa kimia toksik lainnya. Sampai saat ini belum diketahui apakah peningkatan inflamasi, stres oksidatif dan disfungsi endotel terkait langsung dengan nikotin yang terkandung di dalam fasa partikel/tar, atau dipengaruhi pula oleh pengaruh zat toksik lain yang berada di dalam fasa gas asap rokok. Sementara itu di

dalam fasa partikel/tar maupun fasa gas terkandung radikal bebas (Ambrose, 2004). Perokok berat tentunya mengalami paparan zat toksik termasuk radikal bebas lebih banyak daripada perokok ringan.

Ekstrak asap rokok secara *in vitro* dapat menginduksi produksi anion superoksida endotelial melalui aktivasi NADPH oksidase (Jaimes, 2004). Sel endotel manusia yang terpapar serum perokok menunjukkan penurunan kadar NO. Sementara itu pada perokok anion superoksida yang terbentuk menangkap NO, sehingga terjadi penurunan ketersediaan NO dan peningkatan pembentukan *Reactive oxygen species* (ROS), keadaan ini menimbulkan disfungsi endotel (Perlstein, 2006; Barua, 2001; Barua 2003). Selain ekstrak asap rokok, isolat nikotin terbukti secara *in vitro* mengakibatkan penurunan ketersediaan NO (Mayhan, 1996; Mayhan, 1997).

Kerusakan jaringan oleh radikal bebas merupakan faktor utama pada patofisiologis timbulnya stres oksidatif. Stres oksidatif ditandai dengan terjadinya peningkatan 8-epi-prostaglandin (PG)F₂ alpha urin dan plasma, suatu senyawa hasil peroksidasi lipid (Perlstein, 2006).

Respon inflamasi merupakan suatu awal dari terjadinya proses aterosklerosis. Perokok akut dan kronis dapat memodulasi berbagai respons inflamasi. Asap rokok dapat mengaktifasi reaksi inflamasi pada leukosit dan endotel pembuluh darah, yang pada gilirannya akan menginduksi interleukin-6, TNF- α dan protein fasa akut *C-reactive protein* (CRP); demikian pula *intercellular adhesion molecule type 1* (sICAM-1)

meningkat sebagai jawaban terhadap aktivasi endotel pembuluh darah (Ambrose, 2004; Scott, 2005; Perlstein, 2006).

Proses inflamasi, aktivasi endotel pembuluh darah dan pembentukan ROS (stres oksidatif) mengakibatkan terjadinya modifikasi oksidatif dari LDL (Libby, 2002), proses yang sama yang terjadi pula pada perokok (Heitzer, 1996). Pada keadaan ini di dalam dinding pembuluh darah, baik sel busa makrofag maupun sel-sel otot polos melepaskan MMP-9 sebagai jawaban dari LDL-teroksidasi, ROS dan sitokin proinflamasi (TNF- α dan IL-1). Selanjutnya MMP-9 akan mendegradasi membran basal yang mengelilingi sel-sel otot polos, sehingga memungkinkan migrasi sel-sel otot polos dan terjadinya pembentukan *fibrous cap*. Aktivitas proteolitik MMP yang berlebihan mengakibatkan plak menjadi tidak stabil, lebih mudah koyak dan dapat memicu trombosis, dan selanjutnya mengakibatkan infark miokard akut (Szmitko, 2003).

Jelaslah bahwa merokok dapat meningkatkan risiko PJK. Semakin berat derajat merokok semakin besar risiko terjadinya aterosklerosis yang memicu timbulnya berbagai penyakit vaskuler termasuk PJK. Pada penelitian ini ingin diketahui berapa besar frekuensi alel gen CYP2A6 pada populasi Indonesia dan bagaimana polimorfisme genetik CYP2A6 (alel *wild type* dan varian) mempengaruhi risiko perburukan penyakit pada penderita PJK perokok, dengan mengamati terjadinya stres oksidatif (peningkatan konsentrasi F2-Isoprostan serum), inflamasi vaskuler (peningkatan konsentrasi hs-CRP serum) dan perubahan matriks

ekstraseluler (peningkatan konsentrasi MMP-9 serum) pada penderita PJK.

B. Rumusan Masalah

Polimorfisme genetik CYP2A6 belum diketahui variasi dan frekuensinya di Indonesia. Demikian pula hubungannya dengan variasi individual metabolisme nikotin dan kebiasaan merokok yang dapat terkait dengan risiko penyakit jantung koroner. Radikal bebas asap rokok dapat menimbulkan stres oksidatif, aktivasi inflamasi vaskuler, disfungsi endotel sampai kepada perubahan matriks ekstraseluler, yang merupakan dasar di dalam aterosclerosis. Pengaruh ini belum diketahui apakah berhubungan dengan risiko PJK terkait dengan variasi individual kebiasaan merokok yang tergambar dari polimorfisme genetik CYP2A6.

Berdasarkan rumusan masalah di atas, diajukan beberapa pertanyaan di dalam penelitian ini:

1. Bagaimana gambaran frekuensi polimorfisme CYP2A6 pada populasi Indonesia?
2. Bagaimana hubungan polimorfisme genetik CYP2A6 terhadap fenotipe metabolisme nikotin?
3. Bagaimana pengaruh polimorfisme genetik CYP2A6 dan fenotipe metabolisme nikotin terhadap konsumsi rokok penderita PJK?
4. Bagaimana peranan polimorfisme genetik CYP2A6 terhadap stres oksidatif pada penderita PJK?

5. Bagaimana peranan polimorfisme genetik CYP2A6 terhadap inflamasi vaskuler pada penderita PJK?
6. Bagaimana peranan polimorfisme genetik CYP2A6 terhadap perubahan matriks ekstraseluler pada penderita PJK?
7. Bagaimana pengaruh fenotipe metabolisme nikotin, dan konsumsi rokok pada hubungan polimorfisme genetik CYP2A6 dengan konsentrasi F2-Isoprostan, hs-CRP, dan MMP-9 serum pada penderita PJK

C. Tujuan Penelitian

1. Tujuan Umum:

Memahami hubungan polimorfisme genetik CYP2A6 dan metabolisme nikotin dengan stres oksidatif, inflamasi vaskuler dan perubahan matriks ekstraseluler pada penderita penyakit jantung koroner

2. Tujuan Khusus:

- 2.1. Mengetahui besar frekuensi alel gen dan frekuensi genotipe CYP2A6 pada populasi Indonesia
- 2.2. Menilai hubungan polimorfisme genetik CYP2A6 terhadap fenotipe metabolisme nikotin (rasio konsentrasi kotinin/nikotin plasma)
- 2.3. Menilai pengaruh polimorfisme genetik CYP2A6 dan fenotipe metabolisme nikotin terhadap konsumsi rokok penderita PJK

- 2.4. Menilai peranan polimorfisme genetik CYP2A6 terhadap konsentrasi F2-isoprostan serum pada penderita PJK
- 2.5. Menilai peranan polimorfisme genetik CYP2A6 terhadap konsentrasi hs-CRP serum pada penderita PJK
- 2.6. Menilai peranan polimorfisme genetik CYP2A6 terhadap konsentrasi MMP-9 serum pada penderita PJK
- 2.7. Menilai pengaruh fenotipe metabolisme nikotin, dan konsumsi rokok pada hubungan polimorfisme genetik CYP2A6 dengan konsentrasi F2-Isoprostan, hs-CRP, dan MMP-9 serum pada penderita PJK

D. Manfaat Penelitian

1. Manfaat untuk pengembangan ilmu

- Memperoleh data frekuensi alel gen CYP2A6 pada populasi Indonesia
- Memberikan pemahaman tentang pengaruh variasi genetik CYP2A6, metabolisme nikotin dan konsumsi rokok terhadap risiko perburukan penyakit pada penderita PJK yang tercermin dari proses stres oksidatif, inflamasi, dan disfungsi endotel/perubahan matriks ekstraseluler.

2. Manfaat untuk pemecahan masalah kesehatan

Pemeriksaan polimorfisme genetik CYP2A6 dan rasio kotinin/nikotin plasma diharapkan dapat digunakan sebagai penanda risiko perburukan vaskuler pada penderita PJK

perokok, sehingga dapat memotivasi penghentian kebiasaan merokok.

E. Ruang Lingkup/Batasan Penelitian

Sampel untuk studi farmakogenetik diambil dari populasi Indonesia yang tinggal di Makassar dan Jakarta, sedangkan untuk responden PJK diambil dari RS.Wahidin Sudirohusodo Makassar dalam rentang waktu satu tahun dua bulan yaitu dari Januari 2009 – Februari 2010. Tidak mudah untuk memperoleh sampel dari responden PJK dengan berbagai alasan keberatan, sehingga jumlah individu PJK yang merokok dan yang tidak merokok sedikit kurang dari jumlah yang diharapkan. Sampel dari subyek sehat untuk studi farmakogenetik pun beberapa mengalami eksklusi, sehingga sedikit kurang dari jumlah yang diharapkan.

Penetapan fenotipe metabolisme nikotin (rasio kotinin/nikotin) dilakukan di Kanazawa University, divisi Drug Metabolism and Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa, Jepang. Hal ini disebabkan oleh sulitnya kami memperoleh bahan standar untuk kotinin, dan fasilitas di laboratorium kami masih belum mendukung pemeriksaan kotinin dan nikotin.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA / KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS PENELITIAN, DAN VARIABEL PENELITIAN

A. TINJAUAN PUSTAKA / KERANGKA TEORI

1. Sifat fisika dan biokimia rokok

Secara konvensional rokok dibagi atas dua fasa: fasa tar dan gas. Fasa tar atau partikel didefinisikan sebagai material yang terperangkap ketika asap rokok dilewatkan pada filter *Cambridge glass-fiber* yang menahan 99.9% materi partikel dengan ukuran $>0.1\mu\text{m}$. Fasa gas adalah material yang dapat melewati filter tersebut. Fasa partikel (tar) rokok mengandung $>10^{17}$ radikal bebas/g, dan fasa gas mengandung $>10^{15}$ radikal bebas/isapan. Radikal bebas yang berasal dari fasa tar bertahan lama (berjam-jam sampai berbulan-bulan), sedangkan radikal yang berasal dari fasa gas hanya bertahan sebentar (beberapa detik) (Ambrose, 2004).

Fasa partikel mengandung nikotin, suatu komponen fasa tar yang merupakan bahan adiktif dari asap rokok; tar sendiri mengandung banyak zat-zat kimia lain, benzene dan benzo(a)pyrene. Fasa gas mengandung karbon monoksida, amonia, dimetilnitrosamin, formaldehida, hidrogen sianida dan akrolein. Benzo(a)piren dan dimetilnitrosamin dapat menyebabkan kanker. Ditemukan bahwa benzo(a)piren diol epoksida (BPDE) yang ada di dalam tar rokok dapat merusak DNA di dalam suatu

gen penekan tumor (*tumour suppresser gene*) (what's in cigarette factsheet no.12, 2006)).

Rokok tembakau yang dihisap ke dalam mulut seorang perokok aktif dikenal sebagai aliran utama (*mainstream*) dari asap rokok. Aliran samping (*sidestream*) asap rokok adalah asap yang dipancarkan dari ujung rokok yang dibakar. Asap rokok yang ada di lingkungan adalah kombinasi antara asap aliran samping (85%) dan fraksi kecil dari asap rokok aliran utama yang dihembuskan keluar oleh perokok (15%). Asap rokok aliran samping mengandung konsentrasi komponen gas toksik yang relatif tinggi, dibandingkan dengan asap rokok aliran utama. Dari semua kandungan yang ada di dalam rokok, nikotin adalah suatu komponen fasa tar yang merupakan bahan adiktif dari asap rokok (Ambrose, 2004).

Nikotin adalah suatu alkaloid, senyawa utama di dalam tembakau yang menimbulkan ketergantungan pada rokok. *The Royal College of Physicians* di dalam buku *Nicotine Addiction in Britain 2000* telah menegaskan bahwa nikotin menyebabkan adiksi yang menyerupai heroin dan kokain. Bila nikotin murni sebanyak 60 mg diletakkan di atas lidah seseorang maka dalam waktu beberapa menit orang tersebut akan meninggal dunia. Nikotin terkandung di dalam daun tembakau, dan ketika rokok dinyalakan, nikotin akan menguap, membentuk droplet yang asapnya dihisap oleh perokok. Kemudian akan diserap oleh tubuh secara cepat, sampai ke otak dalam waktu 10-19 detik, dan menstimulasi sistem syaraf pusat, meningkatkan denyut jantung dan tekanan darah, yang

mengakibatkan jantung memerlukan lebih banyak oksigen (*Action on Smoking and Health 2006, Factsheet No. 12*).

2. Metabolisme nikotin dan polimorfisme genetik CYP2A6

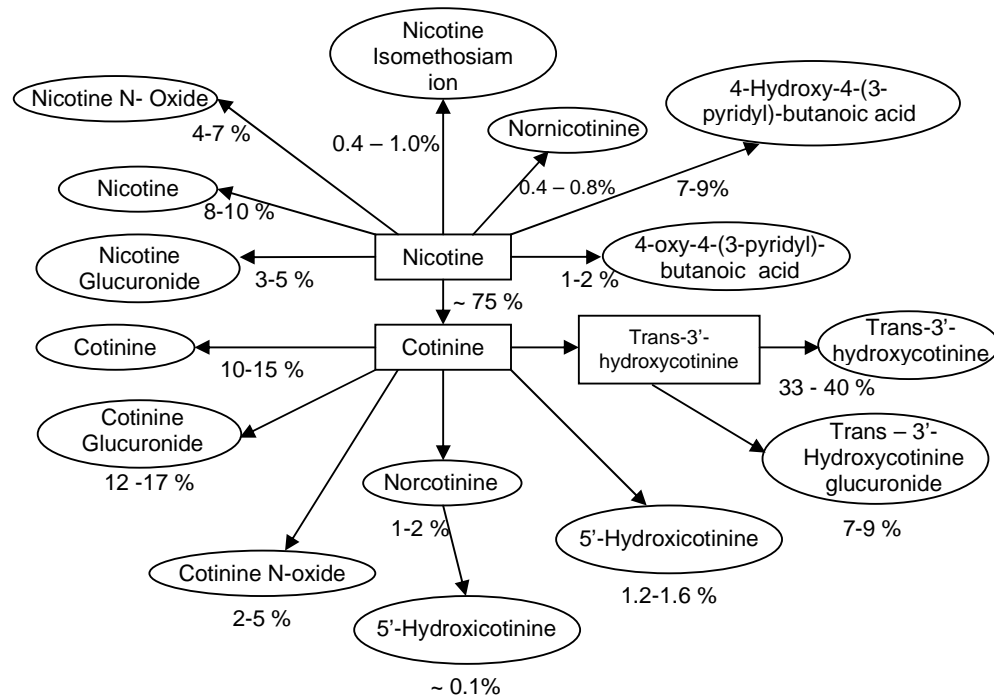
Nikotin pada manusia diinaktivasi terutama menjadi kotinin melalui kerja enzim hepatic sitokrom P450 2A6 (CYP2A6), yang mengkatalisis sekitar 85-90% reaksi biotransformasi ini. CYP2A6 diekspresikan dengan konsentrasi tinggi di hati, dan dengan konsentrasi rendah di mukosa nasal dan saluran pernafasan. CYP2A6 mRNA juga ditemukan di beberapa jenis sel di dalam paru. Struktur gen CYP2A6 terdiri atas 9 exon dan 8 intron, dengan ukuran seluruh gen sekitar 6 kb. CYP2A7 merupakan salah satu dari subfamili gen CYP2A yang letaknya berdampingan dengan gen CYP2A6, namun tidak seperti CYP2A6 yang mengkode protein fungsional, CYP2A7 menghasilkan protein yang inaktif, walaupun CYP2A7 mRNA diekspresikan di hati dalam jumlah yang sama dengan CYP2A6 (Fernandez-Salguero, 1995; Ding, 1995).

Pada saat merokok nikotin dengan cepat dihantarkan ke dalam sirkulasi vena paru, selanjutnya bergerak secara cepat ke dalam ventrikel kiri jantung dan ke dalam sirkulasi arterial sistemik, dan akhirnya menuju otak. Tenggang waktu antara suatu isapan rokok dan tercapainya nikotin ke otak adalah 10 sampai 20 detik. Interval yang pendek antara saat menghisap rokok dan masuknya nikotin ke dalam otak mengakibatkan perokok menyesuaikan kebutuhan dosis nikotin yang diinginkan sebagai efek farmakologis dari nikotin, dan pada akhirnya menyebabkan efek

adiksi. Nikotin terikat di dalam jaringan otak dengan afinitas yang kuat, dan kapasitas pengikatan reseptor meningkat pada perokok dibandingkan dengan bukan perokok. Peningkatan kapasitas pengikatan ini disebabkan oleh jumlah reseptor *nicotinic cholinergic* di dalam otak, yang lebih banyak pada perokok (Hukkanen, 2005).

Metabolisme nikotin begitu kompleks. Nikotin yang merupakan suatu *highly lipid-soluble alkaloid*, diubah menjadi kotinin melalui dua tahap yang melibatkan enzim *cytochrome P450* (CYP450) dan *aldehyde oxidase*. Nikotin dieliminasi terutama oleh metabolisme di hati melalui C-oksidasi menjadi kotinin sebagai metabolit utamanya. Gambar 2.1 menunjukkan skema kuantitatif dari metabolisme nikotin (Hukkanen, 2005). Nikotin memiliki waktu distribusi 15-20 menit dan waktu paruh yang relatif singkat yaitu sekitar 2 jam, sedangkan kotinin kurang lebih 20 jam. Oleh karenanya kotinin merupakan penanda keterpaparan nikotin yang lebih stabil daripada nikotin, baik pada perokok aktif maupun pada perokok pasif yang terpapar asap rokok di lingkungan. Konsentrasi kotinin darah pada perokok aktif sekitar 250-300 ng/mL (Hukkanen, 2005; Malaiyandi, 2005).

Konsentrasi nikotin pada darah vena setelah merokok satu batang rokok berada pada rentang 5 – 30 ng/mL, tergantung dari bagaimana cara menghisap rokoknya. Suatu studi menggambarkan rata-rata konsentrasi nikotin setelah merokok terus-menerus adalah 10,9 ng/mL (Patterson 2003).



Gambar 2.1. Skema kuantitatif dari metabolisme nikotin (Hukkanen, 2005)

2.1. Polimorfisme genetik CYP2A6

CYP2A6 diekspresikan pada hati dan pada konsentrasi rendah di mukosa nasal dan saluran pernafasan. Struktur gen CYP2A6 terdiri atas 9 exon dan 8 intron, dengan ukuran seluruh gen sekitar 6 kb. Gen CYP2A7 berada di sebelah gen CYP2A6. Gen CYP2A6 mengkode protein fungsional, sedangkan gen CYP2A7 memproduksi protein yang inaktif (Yamano, 1990; Fernandez-Salguero, 1995)

CYP2A6 adalah enzim yang memetabolisme beberapa sediaan farmasi seperti coumarin dan asam valproat, beberapa karsinogen seperti 4-(metilnitrosamin)-1-(3-piridil)-1-butanon dan aflatoxin B1, nikotin dan

untuk proses bioaktivasi tegafur menjadi 5-fluorouracil yang mempunyai aktivitas anti-tumor (Inui, 2009).

Polimorfisme genetik CYP2A6 memegang peranan penting di dalam kebiasaan merokok dan ketergantungan pada nikotin. (Malaiyandi, 2005; O'Loughlin, 2004; Perlstein, 2006). Saat ini telah diidentifikasi 49 alel varian gen CYP2A6 (Nakajima, 2007). Alel gen CYP2A6*1A merupakan alel gen *wild type* (normal) yang memberikan efek normal/cepat pada aktivitas metabolisme enzim CYP2A6, sedangkan pada alel gen CYP2A6*4 (CYP2A6*4A, CYP2A6*4B, CYP2A6*4D) tidak ada aktivitas metabolik karena terjadi delesi gen total (*whole gene deletion*). Polimorfisme yang terjadi pada 3'UTR adalah alel gen CYP2A6*1B, karena terjadinya konversi gen di daerah 3' *flanking* dengan gen CYP2A7. Gen CYP2A7 berada kurang lebih 25kb *upstream* dari gen CYP2A6 dengan 96,5% susunan kode nukleotida yang sudah diketahui, gen ini tidak aktif mengkatalisis (Oscarson, 1999a; Nakajima, 2004; Fukami 2006). Alel gen CYP2A6*1B berkaitan dengan meningkatnya konsentrasi ekspresi protein dan aktivitas katalitiknya, yang akan mempengaruhi kecepatan metabolisme nikotin secara *in vivo* (Wang, 2006). Tabel 2.1 menunjukkan alel varian CYP2A6 dan efeknya terhadap aktivitas enzim.

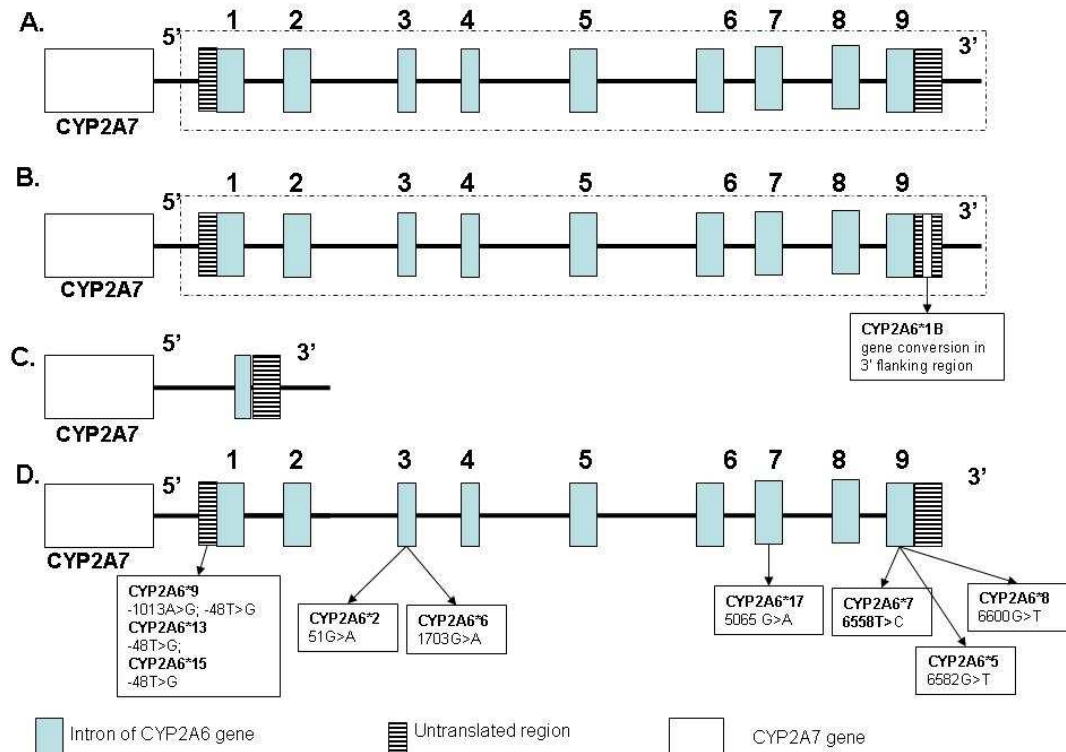
Beberapa alel lainnya memiliki polimorfisme nukleotida tunggal (*single nucleotide polymorphism / SNP*) seperti CYP2A6*2, CYP2A6*5, CYP2A6*6, CYP2A6*7, CYP2A6*8, dan CYP2A6*9 (O'Loughlin 2004, Yoshida 2002).

Tabel 2.1. Alel CYP2A6 dan efek polimorfisme yang ditimbulkan pada aktivitas enzim

Alel	Jenis Polimorfisme	Efek Polimorfisme pada Aktivitas Enzim	Pustaka
CYP2A6*1A	<i>Wild type</i>	Normal	Nakajima, 2001
CYP2A6*1B	Gene conversion with CYP2A7 in 3'- UTR (flanking region)	Meningkat	Oscarson, 1999a
CYP2A6*2	L160H	Tidak ada	Malaiyandi 2005, Yoshida 2002
CYP2A6*3	CYP2A6 / CYP2A7 hybrid	?	Nakajima 2004
CYP2A6*4	CYP2A6 allele gene deleted	Tidak ada	Ariyoshi 2000
CYP2A6*5	G479V	Tidak ada	Yoshida 2002
CYP2A6*6	R128Q	Menurun	Yoshida 2002
CYP2A6*7	I471T	Menurun	Xu 2002
CYP2A6*8	R485L	?	Xu 2002
CYP2A6*9	-1013A>G; -48T>G	Menurun	Minematsu 2006
CYP2A6*10	I471T; R485L	Menurun	Xu 2002
CYP2A6*11	S224P	Menurun	Daigo 2002
CYP2A6*12	10 amino acid substitution CYP2A7 / CYP2A6 hybrid	Menurun	Oscarson 2002
CYP2A6*13	-48T>G; G5R	?	Kiyotani 2002
CYP2A6*14	S29N	?	Kiyotani 2002
CYP2A6*15	-48T>G; K194E	?	Kiyotani 2002
CYP2A6*16	R203S	?	Kiyotani 2002
CYP2A6*17	V365M	Menurun	Nakajima 2006
CYP2A6*18	Y392F	Menurun	Nakajima 2006
CYP2A6*19	Y392F; 1471T	Menurun	Nakajima 2006
CYP2A6*20	Frameshift	Tidak ada	Nakajima 2006

Alel CYP2A6*10 mempunyai substitusi asam amino secara bersamaan dari CYP2A6*7 dan CYP2A6*8. CYP2A6*7 dan CYP2A6*8 memiliki *point mutation* pada exon 9 (Xu 2002, Yoshida 2002). Alel CYP2A6*9 memiliki *point mutation* di dalam TATA box (T-48G) pada daerah 5'-*flanking*. Mutasi ini mengakibatkan aktivitas transkripsi menurun sampai 50% dibandingkan dengan alel *wild type*, demikian juga terjadi

adanya penurunan ekspresi mRNA CYP2A6 (Pitarque, 2001; Yoshida, 2003). Gambar 2.2 menunjukkan situs polimorfisme dari gen CYP2A6.



Gambar 2.2. Susunan gen CYP2A6 dan polimorfismenya

- Gen *wild type* (CYP2A6*1A)
- Gen konversi dengan CYP2A7 pada 3' untranslated region of CYP2A6 (CYP2A6*1B)
- CYP2A6 whole gene deletion (CYP2A6*4)
- Gen CYP2A6 dengan *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP)

Pada alel CYP2A6*7 dan CYP2A6*10 aktivitas metabolisme nikotin terganggu, dan pada individu yang memiliki alel gen CYP2A6*9 ekspresi enzim berkurang sehingga metabolisme nikotin berkurang. Alel CYP2A6*7, CYP2A6*9 dan CYP2A6*10 frekuensinya lebih tinggi pada etnis Cina, Jepang, dan Korea (Asia). Sedangkan pada populasi Caucasian frekuensi alel CYP2A6*2 yang lebih tinggi, dengan defisiensi aktivitas metabolik (Malaiyandi, 2005; Nakajima, 2004).

Walaupun peranan CYP2A6 sudah sangat jelas dalam metabolisme nikotin, namun beberapa studi menunjukkan adanya peranan enzim lain yang dapat mengubah nikotin menjadi kotinin dan 3'-hidroksikotinin, paling tidak ketika tidak ada aktivitas dari enzim CYP2A6. Enzim CYP2B6 adalah enzim hepatic P450 urutan kedua yang aktif dalam C-oksidasi nikotin, terutama ketika konsentrasi nikotinnya tinggi. CYP2D6 juga menunjukkan aktivitasnya pada metabolisme nikotin, tetapi ada juga studi yang menunjukkan tidak terbentuknya kotinin melalui ekspresi CYP2D6. Pada manusia, CYP2D6 *poor metabolizer* dan *extensive metabolizer* memberikan efek fenotipe yang sama pada farmakokinetik nikotin dan kotinin, namun pada fenotipe ultrarapid metabolizer menunjukkan akselerasi metabolisme nikotin, bahkan sampai empat kali lebih cepat pada perokok berat dibandingkan pada individu yang tidak pernah merokok. CYP2E1 juga mempunyai aktivitas metabolisme nikotin secara *in vitro* pada konsentrasi nikotin yang tinggi. CYP2A13 yang sangat dekat hubungannya dengan CYP2A6, mempunyai aktivitas terhadap nikotin dan kotinin, dan juga terhadap zat aditif bahan bakar MTBE (*methyl tertiary butyl ether*), ekspresinya lebih banyak di saluran pernafasan dan mukosa nasal, sangat sedikit di hati, sehingga di dalam klirens nikotin peranannya hanya bila aktivitas enzim CYP2A6 sangat kurang (Hukkanen, 2005; Benowitz 1996).

2.2. Frekuensi alel gen CYP2A6

Perbedaan frekuensi alel gen CYP2A6 pada berbagai etnik telah banyak dipelajari. Frekuensi alel gen CYP2A6 yang telah diteliti dari berbagai populasi di Asia ditunjukkan pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2. Frekuensi alel gen CYP2A6 pada berbagai populasi di Asia

Etnis	Frekuensi alel CYP2A6							Pustaka			
	*1A	*1B	*4	*7	*8	*9	*10				
Cina	43,2	40,6	15,1	6-10	0			Oscarson 1999b			
								15,7	Pittarque 2001		
								0,4	Schoedel 2004		
									Mwenifumbo 2005		
Jepang	42,2	37,5	20,1					Nakajima 2001			
								6,5	2,2	1,1	Yoshida 2002
									21,3		Yoshida 2003
Korea	45,7	42,8	11,0		3,6	1,4		Kwon 2001			
										0,5	Yoshida 2002
									22,3		Yoshida 2003
Melayu	27,0	46,7	7,0	4,3	5,0		4,3	Nurfadhlina 2006			
		14,6	16,7	0	4,2	10,4			Yusof 2009		
Thai	32,0	27,0	14,0	5,0	0	20,0	2,0	Peamkrasatam 2006			
	34,0	35,3	9,3	6,4	0,5	12,1	2,4	Mahavorasirikul 2009			
Vietnam	73,6 (*1)		11,8					Veiga 2009			

3. Implikasi polimorfisme genetik CYP2A6 pada kebiasaan merokok

Kebiasaan menghisap rokok pada perokok dilakukan untuk memenuhi konsentrasi nikotin di dalam darah perokok. Polimorfisme aktivitas enzim CYP2A6 diidentifikasi sebagai alasan utama adanya perbedaan antar individu pada kinetika metabolisme nikotin di dalam mikrosom hati manusia. Variasi individu pada metabolisme nikotin berperan dalam memberi pengaruh pada berat ringannya kebiasaan merokok

seseorang. Pada penelitian lain, perokok yang memiliki alel gen CYP2A6 *wild-type* (CYP2A6*1A) yang homozigot, secara signifikan lebih banyak mengkonsumsi rokok per hari dibandingkan dengan perokok yang heterozigot (pembawa satu alel CYP2A6 yang defektif) (Malaiyandi 2005). CYP2A6*1B dikaitkan dengan peningkatan risiko seseorang menjadi perokok dan merokok dengan konsumsi lebih banyak terutama pada orang Jepang dan Kaukasian (Gambier, 2005). Metabolisme nikotin yang lambat pada individu yang memiliki alel gen mutan mengakibatkan paparan yang lebih panjang terhadap nikotin, dan menyebabkan perasaan tidak nyaman (sakit kepala, mual) karena terjadi intoksikasi nikotin, oleh karenanya individu ini hanya membutuhkan konsumsi rokok yang lebih sedikit per harinya. Metabolisme lambat pada perokok baru, menurunkan risiko seseorang menjadi pecandu rokok, yang berkaitan dengan keengganan untuk terpapar nikotin. Seseorang dengan metabolisme nikotin yang cepat, konsumsi rokok per harinya lebih banyak untuk menjaga kadar nikotin dan lebih berisiko menjadi pecandu rokok. Dari sekian banyak faktor yang mempengaruhi perilaku awal perokok, metabolisme nikotin merupakan satu aspek yang penting (Ahijevych, 2006; Malaiyandi, 2005; O'Loughlin 2004). Beberapa kelompok peneliti menunjukkan hubungan antara polimorfisme CYP2A6 dengan kebiasaan merokok. Kamataki *et al* melaporkan perokok Jepang mengkonsumsi rokok lebih sedikit pada individu pembawa polimorfisme CYP2A6*4, *7, *9, dan *10, dibandingkan dengan perokok dengan metabolisme normal pembawa alel gen *wild type* *1A. Demikian juga Tyndale *et al*

menunjukkan konsumsi rokok yang lebih sedikit pada perokok Kaukasian pembawa polimorfisme CYP2A6*2, *4, *9, dan *12 (Nakajima 2007). Namun ada pula beberapa studi yang melaporkan tidak adanya hubungan antara perilaku merokok dengan varian alel CYP2A6 (Ando, 2003; Carter, 2004). O'Loughin *et al* melaporkan individu pembawa alel CYP2A6*2 dan *4 mempunyai risiko menjadi pecandu rokok (O'Loughin 2004). Pada populasi Jepang homozigot CYP2A6*4 cenderung untuk berhenti merokok, tetapi karier CYP2A6*4 (pada heterozigot dengan *wild type*) memiliki kecenderungan sulit berhenti merokok apabila mereka sudah memiliki kebiasaan merokok (Ozaki, 2006; Minematsu, 2003).

4. Merokok dan penyakit vaskuler aterosklerotik

Merokok dapat meningkatkan risiko sindroma aterosklerotik klinis, termasuk PJK atau penyakit vaskuler lainnya (termasuk stroke), melalui mekanisme stres oksidatif, inflamasi, disfungsi endotel dan perubahan matriks ekstraseluler. Dari suatu studi kasus-kontrol secara multisenter tentang kejadian infark miokard yang pertama kali dialami, ditemukan bahwa merokok memberikan kontribusi 36% dari populasi yang berisiko, dan risiko ini meningkat sejalan dengan peningkatan jumlah perokok (Perlstein, 2006). Dilaporkan pula bahwa baik pada perokok aktif maupun pasif ditemukan peningkatan ketebalan intimal-medial pada arteri karotid menggunakan carotid ultrasound (Ambrose, 2004)

Risiko PJK dan perkembangannya erat kaitannya dengan proses inisiasi, progresi dan koyaknya plak aterosklerosis. Mediator inflamasi,

aktivasi sel endotel, dan stres oksidatif berperan penting di dalam proses aterogenesis dan ketidak stabilan plak aterosklerosis, yang akan mempengaruhi perkembangan penyakit vaskuler tersebut (Szmítko, 2003; Griending, 2003).

Ekstrak rokok (*Cigarette smoke extract / CSE*) atau senyawa isolatnya seperti nikotin mengakibatkan penurunan ketersediaan *Nitric Oxyde* (NO) akibat penghambatan aktivitas *Nitric Oxyde synthase* (uncoupled NOS) (Ambrose, 2004), hal ini juga terkait dengan penangkapan NO oleh superoksida yang berasal dari rokok, sehingga terjadi peningkatan *reactive oxygen species* (ROS). Peningkatan ROS menimbulkan stres oksidatif yang terjadi pada dinding pembuluh darah (Perlstein, 2006; Griending, 2003). Mekanisme inilah yang menimbulkan gangguan vasodilatasi endotel (EDV). Menurunnya EDV merupakan salah satu efek patofisiologis terawal dari berbagai faktor risiko aterosklerosis, mendahului perubahan morfologi di dalam dinding pembuluh darah (Barua, 2001). Senyawa stabil thiol-reaktif di dalam rokok dapat mengaktifkan NADPH oksidase dan meningkatkan produksi anion superoksida, oleh karenanya menurunkan biokativitas NO dan mengakibatkan terjadinya disfungsi endotel (Jaimes, 2004). Mekanisme di atas menjelaskan proses patobiologi yang terlibat secara potensial di dalam PJK yang terkait dengan merokok (*smoking-related cardiovascular disease*).

4.1. F2-Isoprostan pada perokok dan PJK

Isoprostan merupakan senyawa golongan prostaglandin, merupakan produk hasil enzim siklooksigenase melalui proses peroksidasi asam arakhidonat yang dikatalisis oleh radikal bebas. F2-isoprostan dibentuk sebagai respon terhadap stres oksidan, awalnya secara *in situ*, melalui pembentukan radikal peroksil dari asam arakhidonat di dalam fosfolipid. Isoprostan dipecah secara bertahap dan dilepaskan ke dalam plasma sebagai hasil dari kerja fosfolipase A2. Salah satu senyawa yang terbanyak dilepaskan adalah 8-epi-prostaglandin (PG)F₂ atau F₂-isoprostan (suatu senyawa hasil peroksidasi lipid) yang memiliki aktivitas biologis. Senyawa ini merupakan suatu vasokonstriktor di dalam pembuluh darah paru dan ginjal, juga sebagai suatu mitogen di dalam sel otot polos pembuluh darah (Reilly, 1996).

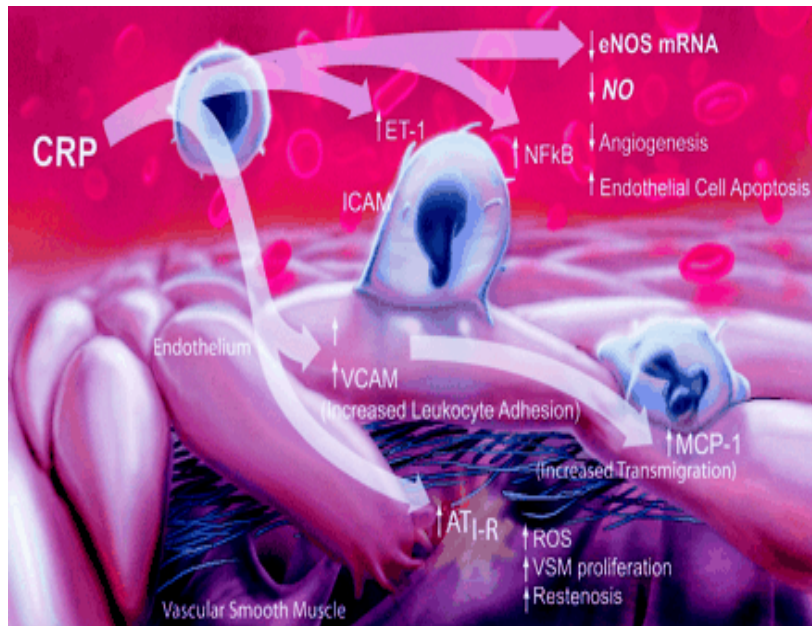
Sebagaimana diketahui bahwa asap rokok mengandung banyak oksidan, hal ini sering dikaitkan dengan hipotesis timbulnya efek buruk dari merokok dihasilkan melalui proses kerusakan oksidatif terhadap senyawa biologis tertentu. Hasil penelitian Morrow *et al* menunjukkan pembentukan hidroperoksida lipid setelah plasma darah manusia diberikan/diekspos dengan fase gas dari asap rokok, dan pengukuran konsentrasi F₂-isoprostan lebih baik daripada pengukuran malondealdehid sebagai indeks peroksidasi lipid secara *in vivo*. (Morrow, 1995). Pembentukan isoprostan yang disebabkan oleh radikal bebas belum diketahui secara pasti apakah terjadi secara langsung atau melalui aktivasi monosit, makrofag, dan trombosit, padahal sel-sel ini pun

menghasilkan radikal bebas. Reilly menemukan ekskresi 8-*epi*-PGF₂ alpha urin meningkat pada perokok dan konsentrasinya pada perokok berat lebih tinggi dibandingkan dengan perokok yang lebih ringan, sedangkan Morrow menemukan konsentrasi F₂-isoprostan di dalam plasma dan urin perokok lebih tinggi secara signifikan dibandingkan dengan konsentrasinya pada bukan perokok, dan terdapat korelasi yang signifikan antara ekskresi metabolit F₂-isoprostan di urin dengan konsentrasi F₂-isoprostan bebas yang bersirkulasi di dalam plasma (Reilly, 1996; Morrow, 1995; Perlstein, 2006). Konsentrasi F₂-isoprostan yang lebih tinggi pada perokok dibandingkan dengan bukan perokok merupakan bukti bahwa merokok dapat menyebabkan modifikasi komponen biologik pada manusia, hal ini diperkuat dengan ditunjukkannya penurunan konsentrasi F₂-isoprostan secara signifikan pada perokok setelah 2 minggu berhenti merokok. Hasil-hasil penelitian ini merupakan dasar bagi hipotesis adanya kaitan antara kerusakan oksidatif yang diakibatkan oleh biomolekul-biomolekul tubuh dengan patogenesis penyakit akibat merokok (Morrow, 1995). Modifikasi oksidatif terhadap Low-density lipoprotein (LDL) merupakan proses kunci dari perkembangan aterosklerosis, sehingga penemuan adanya modifikasi oksidasi pada lipid plasma perokok dapat menjelaskan mekanisme yang menghubungkan antara merokok dan aterogenesis.

4.2. C-reactive protein (CRP) pada perokok dan PJK

C-reactive protein merupakan suatu pentraxin yang ada di dalam sirkulasi, yang berperan di dalam respon imun awal (*human innate immune*) (Du Clos, 2000), dan merupakan penanda biokimia plasma yang stabil untuk inflamasi sistemik (*low grade*). CRP diproduksi terutama di hati sebagai bagian dari respons fasa akut. Namun demikian CRP juga diekspresikan di dalam sel otot polos pada arteri yang mengalami aterosklerosis (Calabro, 2003), dan menimbulkan berbagai pengaruh pada proses aterogenesis dan ketidak stabilan plak aterosklerosis, melibatkan ekspresi molekul adhesi, induksi NO, perubahan fungsi komplemen, dan penghambatan fibrinolisis (Tsimikas, 2006). Kemampuan CRP untuk menghambat sel progenitor endotel diduga sebagai suatu mekanisme penting yang menghambat kompensasi angiogenesis pada iskemia kronik. Oleh karena itu CRP tidak hanya berperan sebagai penanda inflamasi dari aterosklerosis, namun juga sebagai mediator penyakit arteri koroner karena berkontribusi pada pembentukan lesi aterosklerosis, koyaknya plak, dan trombosis arteri koroner melalui interaksinya pada aktivasi endotel, Gambar 2.3 menunjukkan peranan CRP di dalam menimbulkan inflamasi dan aktivasi endotel (Szmítko, 2003, Part I).

Konsentrasi plasma CRP ditetapkan melalui pemeriksaan *high-sensitivity* CRP, yang memberikan gambaran prognostik terkait dengan risiko serangan jantung berulang pada penderita angina stabil dan pada sindrom arteri koroner (Ridker, 1998). hs-CRP juga merupakan prediktor independen untuk risiko timbulnya PJK pada orang sehat (Rifai, 2001).



Gambar 2.3. Peranan CRP dalam proses inflamasi dan aktivasi endotel (Szmítko, 2003, Part I)

Berdasarkan data yang tersedia pada tahun 2002, *the Centers for Disease Control and Prevention* dan *the American Heart Association* menetapkan penggunaan hs-CRP sebagai suatu penanda untuk memprediksi risiko PJK secara global, terutama pada individu dengan risiko sedang (*intermediate risk*) (Pearson, 2003). Pada pedoman ini juga dihimbau untuk menggunakan hs-CRP untuk menstratifikasi risiko terjadinya iskemia akut dan untuk pencegahan serangan sekunder.

Inflamasi dan stres oksidatif pada dinding arteri merupakan fenomena sentral dari patogenesis dari aterosklerosis (Libby, 2002). Kekuatan asap rokok dalam menginduksi inflamasi vaskuler dan stres oksidatif menjadi dasar dari efek buruk merokok pada patofisiologi vaskuler (Ambrose, 1004). Plasma darah perokok biasanya memiliki jumlah leukosit yang lebih tinggi, diikuti dengan peningkatan protein-

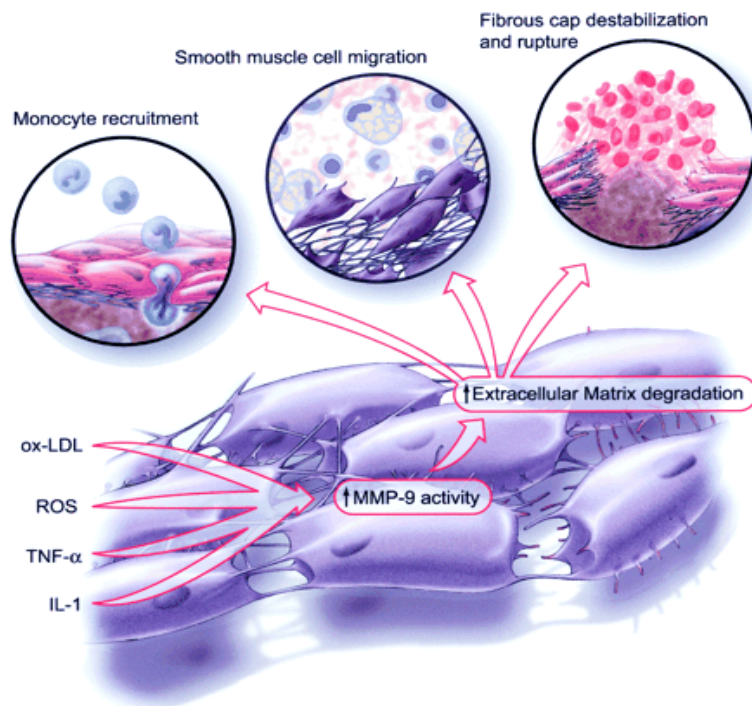
protein inflamasi seperti CRP, interleukin (IL)-6, *soluble intercellular adhesion molecule type 1* (sICAM-1), *E-selectin*, dan *P-selectin* (Perlstein, 2006). Merokok merupakan variabel prediktif utama di dalam meningkatkan hs-CRP pada pria sehat, walaupun konsentrasinya meningkat pula pada faktor risiko PJK lainnya, seperti usia lanjut, peningkatan BMI dan kadar kolesterol darah yang tinggi (Winkelmann, 2009).

4.3. Matrix Metalloproteinase (MMP) pada perokok dan PJK

Peranan MMP dalam patogenesis penyakit paru obstruktif kronik (COPD) terkait merokok, merupakan paradigma dasar bagi kemungkinan peranan potensial dari MMP pada penyakit jantung koroner (PJK) terkait merokok. Rokok menstimulasi inflamasi sel yang dapat merusak matriks ekstraseluler paru, dan mengakibatkan emfisema. MMP juga berperan di dalam *vascular remodeling* sel paru yang diakibatkan karena rokok. Asap rokok yang menginduksi inflamasi dan stres oksidatif sangat potensial memicu ekspresi gen metaloproteinase, kemudian menginduksi aktivasi pro-enzim, dan menghambat aktivitas inhibitor dari metaloproteinase endogen (*tissue inhibitors of metalloproteinase/TIMP*) (Perlstein, 2006).

Kondensat rokok meningkatkan molekul-molekul sel adhesi (ICAM-1) di dalam sel endotel melalui aktivasi protein kinase C, yang merupakan jalur sintesis TGF- β . Peningkatan konsentrasi TGF- β karena merokok disisi lain dapat menghambat ekspresi gen metaloproteinase dan menginduksi TIMP. Nikotin meningkatkan TGF- β dan senyawa dasar

growth factor fibroblast dari sel endotel aortik pada hewan percobaan (Esmatjes, 1999; Perlstein, 2006). Disfungsi endotel yang ditandai dengan adanya gangguan pada fisiologi endotel ini merupakan tahap awal penentu perkembangan aterosklerosis dan komplikasinya (Bonetti, 2003). Pro-MMP-9 disekresi oleh monosit, makrofag, neutrofil, fibroblast, dan sel endotel. Ekspresi pro-MMP-9 ditingkatkan oleh TGF- β 1, TGF- α , IL-1 β , IL-1 α , dan TNF- α yang terjadi pada proses inflamasi (R&D package insert 2007, Ueda, 1996). Sel endotel yang terpapar kondensat rokok menginduksi ekspresi metaloproteinase (MMP-1, MMP-8, **MMP-9**). Senyawa MMP ini mengakibatkan terjadinya *vascular remodeling* yaitu suatu perubahan matriks ekstraseluler, dan ketidak-stabilan plak aterosklerosis (Perlstein, 2006).



Gambar 2.4. Peranan MMP-9 mulai dari progresi sampai dengan destabilisasi plak aterosklerosis (Szmitko, 2003, Part II)

MMP-9 terlibat dalam beberapa tahapan aterosklerosis. Degradasi matriks mengakibatkan rekrutmen monosit yang merupakan awal mula terjadinya aterosklerosis. Di dalam dinding pembuluh darah, sel busa makrofag dan sel-sel otot polos mensekresi MMP-9 sebagai respon terhadap LDL-teroksidasi, radikal bebas, TNF- α , dan IL-1 (Gambar 2.4). LDL teroksidasi merupakan mekanisme yang menghubungkan proses aterogenesis dan merokok. Selanjutnya MMP-9 akan mendegradasi membran basal yang mengelilingi sel-sel otot polos, sehingga bermigrasi dan membentuk fibrous cap. Aktivitas proteolitik MMP yang berlebihan akan menyebabkan plak menjadi tidak stabil (Szmitko, 2003). Blankenberg menyimpulkan kadar MMP-9 dapat digunakan sebagai prediktor mortalitas pada penderita PJK (Blankenberg, 2003).

4.4. Kebiasaan merokok dan risiko PJK

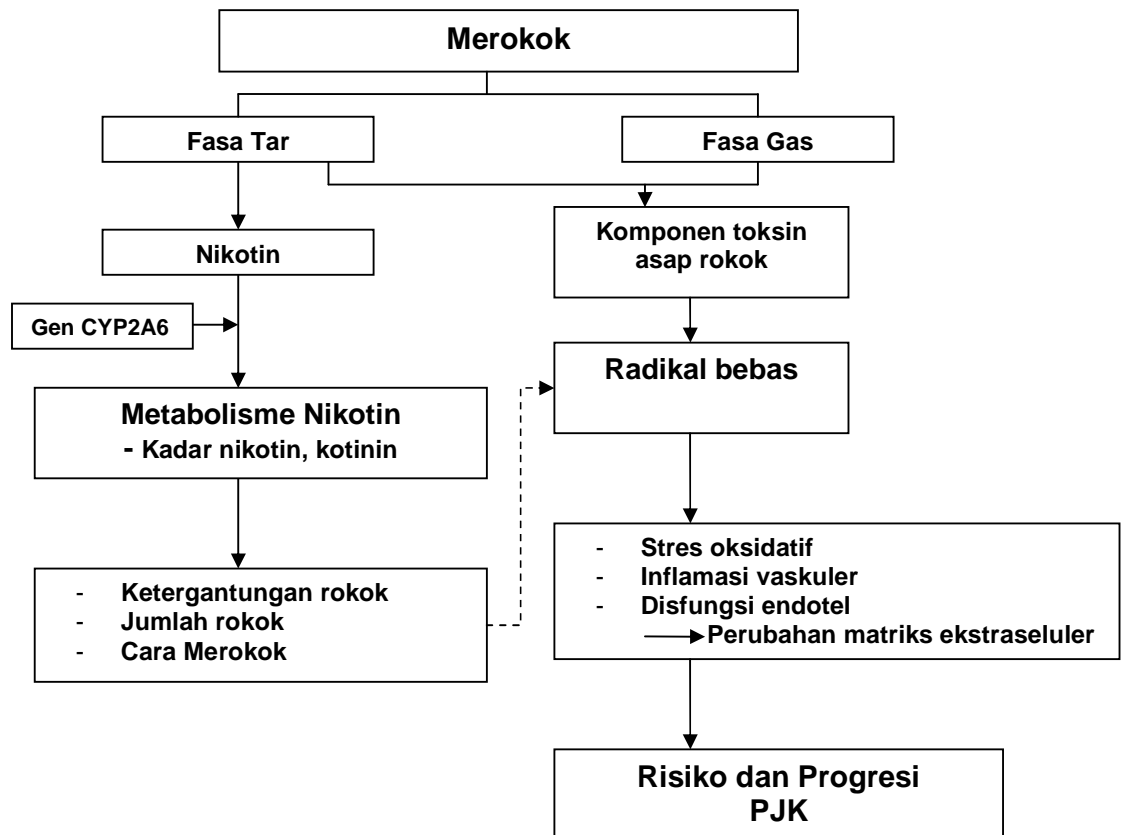
Risiko PJK erat kaitannya dengan proses perkembangan aterosklerosis. Stres oksidatif, aktivasi sel endotel, dan mediator inflamasi berperan penting di dalam proses aterogenesis dan ketidak stabilan plak aterosklerosis, yang akan mempengaruhi perkembangan penyakit vaskuler termasuk PJK (Szmitko, 2003; Griendling, 2003).

Bahaya yang ditimbulkan oleh merokok tergantung pada faktor: usia mulai merokok, jumlah rokok per hari, sifat/jenis rokok (tar dan kandungan nikotin atau jenis filter) dan kebiasaan merokok (derajat inhalasi). Polimorfisme genetik CYP2A6 pada perokok mempengaruhi derajat ketergantungan/berat-ringannya merokok dan berinteraksi

terhadap timbulnya stres oksidatif (peningkatan konsentrasi F2-Isoprostan serum), disfungsi endotel dan inflamasi vaskuler (peningkatan konsentrasi hs-CRP serum), dan perubahan matriks ekstraseluler (peningkatan konsentrasi MMP-9 serum), yang pada gilirannya akan menimbulkan risiko PJK.

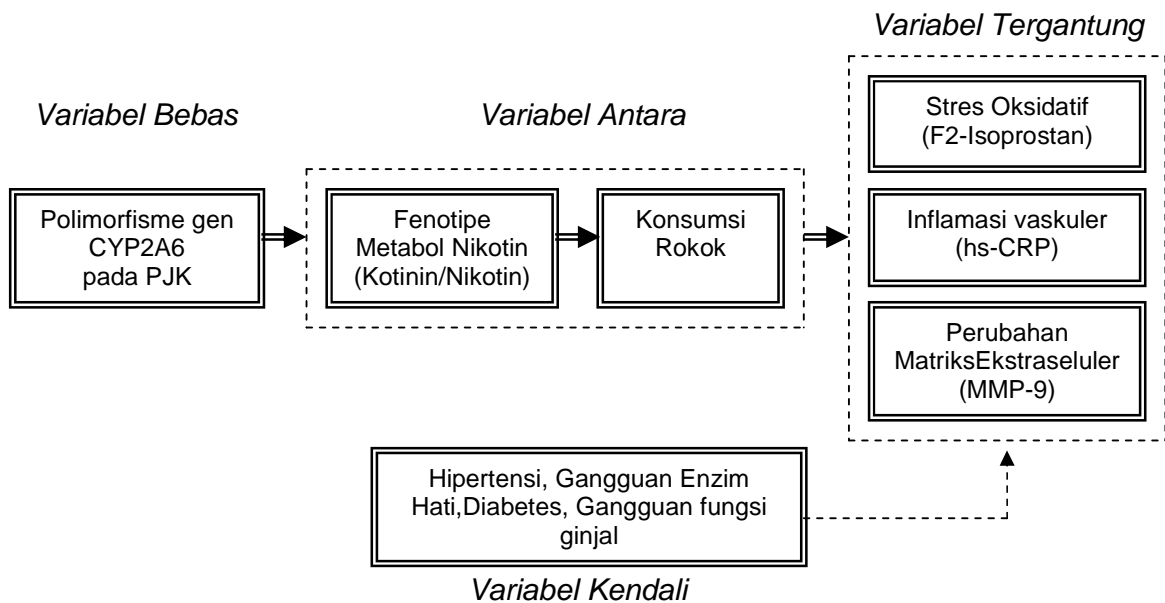
Dari uraian di atas maka kerangka teori dapat dijabarkan dalam bentuk diagram berikut:

KERANGKA TEORI



Penelitian ini ditujukan untuk melihat interaksi tersebut di atas, yang dituangkan di dalam kerangka konsep berikut:

B. KERANGKA KONSEP



C. VARIABEL PENELITIAN

1. Variabel bebas : Polimorfisme genetik CYP2A6 pada PJK
2. Variabel antara : Rasio konsentrasi kotinin/nikotin plasma, Konsumsi rokok (ringan-sedang-berat)
3. Variabel tergantung : Konsentrasi F2-Isoprostan serum, konsentrasi hsCRP serum, dan konsentrasi MMP-9 serum
4. Variabel Kendali : Hipertensi, gangguan enzim hati, diabetes, gangguan fungsi ginjal

D. HIPOTESIS PENELITIAN

1. Polimorfisme genetik CYP2A6 pada populasi Indonesia memberikan gambaran frekuensi yang berbeda dengan populasi Asia lainnya
2. Ada hubungan antara polimorfisme genetik CYP2A6 dengan fenotipe metabolisme nikotin
3. Ada pengaruh polimorfisme genetik CYP2A6 dan metabolisme nikotin terhadap konsumsi rokok pada penderita PJK
4. Polimorfisme genetik CYP2A6 berpengaruh terhadap risiko peningkatan stres oksidatif pada penderita PJK
5. Polimorfisme genetik CYP2A6 berpengaruh terhadap risiko peningkatan inflamasi vaskuler pada penderita PJK
6. Polimorfisme genetik CYP2A6 berpengaruh terhadap risiko perubahan matriks ekstraseluler pada penderita PJK
7. Fenotipe metabolisme nikotin dan konsumsi rokok berpengaruh pada hubungan polimorfisme genetik CYP2A6 dengan konsentrasi F2-isoprostan, hs-CRP, MMP-9 serum pada penderita PJK