



**UJI BIOAVAILABILITAS DAN VOLUME DISTRIBUSI TEOBROMIN
SETELAH PEMBERIAN *DARK CHOCOLATE BAR* PER ORAL
PADA SUKARELAWAN SEHAT**

SKRIPSI

Oleh

**Monica Bethari Primanesa
NIM 122010101029**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER**

2015



**UJI BIOAVAILABILITAS DAN VOLUME DISTRIBUSI TEOBROMIN
SETELAH PEMBERIAN *DARK CHOCOLATE BAR* PER ORAL
PADA SUKARELAWAN SEHAT**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Pendidikan Dokter (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran

Oleh

Monica Bethari Primanesa
NIM 122010101029

FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Tuhan Yesus Kristus, yang telah memberikan berkat dan kelimpahan rahmat, serta selalu menyertai saya dalam menjalani hidup;
2. kedua orangtua saya, Ayahanda Agung Roesmiardi dan Ibunda Catharina Titah Pancasilaswati, serta Adik Andreas Carmananda Pamungkas atas semua doa, dukungan, bimbingan, kasih sayang, serta pengorbanan yang telah diberikan untuk saya setiap saat;
3. guru-guruku sejak taman kanak-kanak sampai perguruan tinggi, yang telah menempa dan mendidik saya untuk menjadi manusia yang berilmu dan beriman;
4. keluarga besar *Panacea* Fakultas Kedokteran Universitas Jember Angkatan 2012;
5. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

MOTO

“Mintalah, maka akan diberikan kepadamu; carilah, maka kamu akan mendapat; ketoklah, maka pintu akan dibukakan bagimu. Karena setiap orang yang meminta, menerima dan setiap orang yang mencari, mendapat dan setiap orang yang mengetok, baginya pintu akan dibukakan”

(Terjemahan Injil Matius 7:7-8) *)

“Ia membuat segala sesuatu indah pada waktunya, bahkan Ia memberikan kekekalan dalam hati mereka. Tetapi manusia tidak dapat menyelami pekerjaan yang dilakukan Allah dari awal sampai akhir”

(Terjemahan Pengkhotbah 3:11) *)

*) Lembaga Alkitab Indonesia. *Alkitab Untuk Remaja*. 2009. Jakarta: Percetakan Lembaga Alkitab Indonesia

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Monica Bethari Primanesa

NIM : 122010101029

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Uji Bioavailabilitas dan Volume Distribusi Teobromin Setelah Pemberian *Dark Chocolate Bar* Per Oral pada Sukarelawan Sehat” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 10 Desember 2015

Yang menyatakan,

Monica Bethari Primanesa

NIM 122010101029

SKRIPSI

**UJI BIOAVAILABILITAS DAN VOLUME DISTRIBUSI TEOBROMIN
SETELAH PEMBERIAN *DARK*
CHOCOLATE BAR PER ORAL PADA
SUKARELAWAN SEHAT**

Oleh

Monica Bethari Primanesa

NIM 122010101029

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama: dr. Cholis Abrori, M.Kes., M.Pd.Ked.

Dosen Pembimbing Anggota: dr. Muhammad Hasan, M.Kes., Sp.OT.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Uji Bioavailabilitas dan Volume Distribusi Teobromin Setelah Pemberian *Dark Chocolate Bar* Per Oral pada Sukarelawan Sehat” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Kamis, 10 Desember 2015

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Penguji I,

Penguji II,

dr. Desie Dwi Wisudanti, M.Biomed .
NIP 198212112008122002

dr. Ika Rahmawati S., M.Biotech.
NIP 198408192009122003

Penguji III,

Penguji IV,

dr. Cholis Abrori, M.Kes., M.Pd.Ked.
NIP 197105211998031003

dr. M. Hasan, M.Kes., Sp.OT.
NIP 196904111999031001

Mengesahkan
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember,

dr. Enny Suswati, M.Kes.
NIP 197002141999032001

RINGKASAN

Uji Bioavailabilitas dan Volume Distribusi Teobromin Setelah Pemberian *Dark Chocolate Bar Per Oral* Pada Sukarelawan Sehat; Monica Bethari Primanesa, 122010101029; 2015; 74 halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Metilxantin, yang terdiri dari kafein, teobromin, dan teofilin, merupakan salah satu dari tiga senyawa terbanyak yang terkandung dalam cokelat, dengan jumlah yang tertinggi adalah teobromin. Teobromin merupakan zat aktif yang memiliki sifat lebih lemah daripada kafein, berefek diuretik yang lemah, relaksan otot polos bronkus, dan stimulan yang lemah pada sistem saraf pusat. Efek teobromin bergantung pada besarnya dosis. Telah diketahui bahwa semakin tinggi dosis teobromin maka menimbulkan efek negatif pada sistem saraf pusat, seperti disforia. Hingga saat ini, masyarakat mengonsumsi cokelat secara luas, bebas, dan tanpa aturan tertentu. Fenomena tersebut menjadi tujuan dari penelitian ini, yaitu mengetahui bioavailabilitas dan volume distribusi teobromin setelah konsumsi *dark chocolate bar per oral*, pada akhirnya dapat menentukan keamanan cokelat yang dikonsumsi.

Jenis penelitian ini adalah *Pre-Experimental Design* dengan bentuk *One-Shot Case Study*. Penelitian ini menggunakan tiga sukarelawan sehat yang mengonsumsi *dark chocolate bar* dengan berat 70 gram. Masing-masing sukarelawan diambil darahnya sebanyak enam kali dengan cara pungsi vena pada vena mediana cubiti, pertama pada jam ke-0 sebelum sukarelawan mengonsumsi *dark chocolate*. Selanjutnya dilakukan pengambilan pada jam ke-1¹/₂, 3, 6, 10, dan 24 setelah *dark chocolate* habis dikonsumsi oleh sukarelawan. Darah disimpan dalam *heparin tube*, kemudian dilakukan sentrifugasi sehingga didapatkan plasma. Plasma yang didapat

dilakukan preparasi terlebih dahulu sebelum diinjeksikan ke dalam instrumen *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC).

Hasil dari penelitian ini didapatkan rata-rata konsentrasi teobromin pada jam ke-0, 1^{1/2}, 3, 6, 10, dan 24 berturut-turut adalah 0,271; 4,009; 4,497; 3,556; 2,675; 0,955 dalam mg/L. Kadar teobromin dalam *dark chocolate bar* yang digunakan dalam penelitian ini adalah 301,379 mg/70 gram. Bioavailabilitas dan volume distribusi teobromin yang didapatkan adalah 0,69 dan 0,566 L/kg. Sehingga pemberian satu batang *dark chocolate bar* yang digunakan dalam penelitian ini masih dalam batas aman untuk dikonsumsi.

PRAKATA

Puji syukur kepada Tuhan Yesus Kristus atas segala berkat, rahmat, dan karunia yang telah dicurahkan dan dilimpahkan sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “Uji Bioavailabilitas dan Volume Distribusi Teobromin Setelah Pemberian *Dark Chocolate Bar* Per Oral pada Sukarelawan Sehat” ini tanpa suatu hambatan yang berarti. Skripsi ini disusun untuk memenuhi persyaratan dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan banyak pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terimakasih kepada:

1. dr. Enny Suswati, M.Kes. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember atas segala fasilitas dan kesempatan yang diberikan selama menempuh pendidikan kedokteran di Universitas Jember;
2. dr. Cholis Abrori, M.Kes., M.Pd.Ked. selaku Dosen Pembimbing Utama dan dr. Muhammad Hasan, M.Kes., Sp.OT selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga, dan perhatiannya dalam penulisan skripsi ini;
3. dr. Desie Dwi Wisudanti, M.Biomed. dan dr. Ika Rahmawati Sutejo, M.Biotech. selaku dosen penguji yang telah memberi kritik, saran, dan masukan yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
4. dr. Rini Riyanti, Sp.PK selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing penulis selama menjadi mahasiswa;
5. keluarga tercinta, Papa Agung Roesmiardi, Mama Catharina Titah Pancasilaswati, dan Adik Andreas Carmananda Pamungkas atas dukungan moril, materi, doa, dan semua curahan kasih sayang yang tak akan pernah putus;

6. saudaraku Bagus Dwi Kurniawan dan saudariku Nyoman Defriyana Suwandi, yang telah memberikan dukungan, semangat, dan motivasi dalam menyelesaikan skripsi yang berharga ini;
7. sahabat-sahabatku Edda Rachmadenawanti, Sarah Andriani, Yessie Elin S., Irene Qitta Pranindita, Intan Palupi, Putu Ratih, Ghuiranda Syabannur R., Ivan Kristantya, Fahmi Rosyadi, Annisa Rizki H., Geraldi Kusuma W., dan A. M. Fauzi atas kasih sayangnya untukku, motivasi, dan dukungan, serta doanya dalam penyelesaian skripsi ini;
8. teman-teman yang telah membantu dalam penelitian, Ngurah Agung Reza Satria, Damara Krishnatama, Nyoman Suryadinata Astina P., Ronni Handoyo, Yosalfa Adhista, dan Adhang Isdyarsa;
9. analis Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Jember Nurul Istiharoh, analis Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember Lilik M., serta analis Laboratorium Kimia dan Instrumen Fakultas Farmasi Universitas Jember Hanny Indah yang telah membantu dan selalu memberikan dorongan semangat;
10. rekan sejawatku angkatan 2012 yang telah berjuang bersama-sama demi gelar Sarjana Kedokteran;
11. almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
12. semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran yang membangun dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, Desember 2015

Penulis

DAFTAR ISI

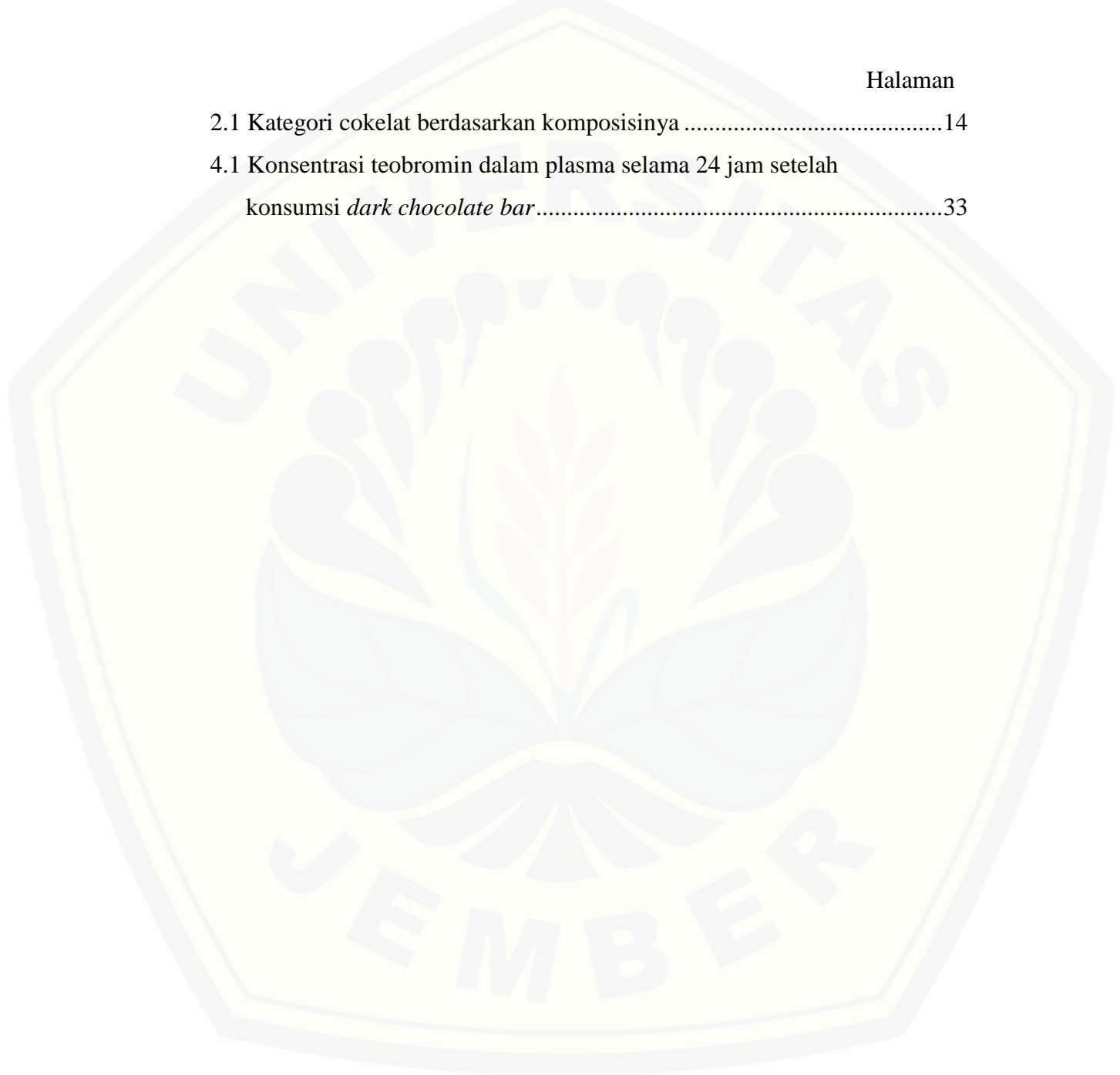
	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Cokelat	6
2.1.1 <i>Theobroma cacao</i>	6
2.1.2 Kakao dalam Dunia Kesehatan.....	7
2.1.3 Kakao untuk Pangan.....	12
2.2 Parameter Farmakokinetik	14

2.2.1 Bioavailabilitas	14
2.2.2 Volume Distribusi	15
2.3 Teobromin	16
2.3.1 Biosintesis teobromin	16
2.3.2 Efek teobromin	18
2.3.3 Farmakologi teobromin	20
2.4 Kerangka Konseptual.....	20
BAB 3. METODE PENELITIAN	21
3.1 Jenis Penelitian.....	21
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	21
3.3 Populasi dan Sukarelawan Penelitian.....	21
3.3.1 Kriteria Inklusi Sukarelawan	21
3.3.2 Kriteria Eksklusi Sukarelawan	22
3.3.3 Syarat Lain Sukarelawan	22
3.4 Variabel Penelitian	23
3.5 Definisi Operasional	23
3.5.1 <i>Dark Chocolate Bar</i>	23
3.5.2 Kadar teobromin dalam coklat.....	23
3.5.3 Kadar teobromin dalam darah	24
3.5.4 <i>High Performanced Liquid Chromatography (HPLC)</i>	25
3.5.5 Bioavailabilitas Teobromin	25
3.5.6 Volume Distribusi Teobromin.....	27
3.6 Bahan dan Alat Penelitian	27
3.7 Rancangan Penelitian.....	28
3.8 Prosedur Pengambilan dan Analisis Data.....	28
3.8.1 Uji Kelayakan Etik	28
3.8.2 Pengambilan Data.....	28
3.8.3 Analisis Data.....	29
3.8.4 Skema Alur Penelitian	31

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	32
4.1 Hasil Penelitian	32
4.1.1 Kandungan Teobromin dalam Cokelat.....	32
4.1.2 Data Konsentrasi Teobromin dalam Plasma setelah Konsumsi <i>Dark Chocolate Bar</i>	32
4.1.3 Bioavailabilitas Teobromin setelah Konsumsi <i>Dark Chocolate Bar</i>	34
4.1.4 Volume Distribusi Teobromin setelah Konsumsi <i>Dark Chocolate Bar</i>	37
4.2 Pembahasan	37
4.2.1 Bioavailabilitas Teobromin setelah Konsumsi <i>Dark Chocolate Bar</i>	37
4.2.2 Volume Distribusi Teobromin setelah Konsumsi <i>Dark Chocolate Bar</i>	39
4.2.3 Keamanan <i>Dark Chocolate Bar</i>	40
BAB 5. PENUTUP.....	42
5.1 Kesimpulan	42
5.2 Saran	42
DAFTAR PUSTAKA	43
LAMPIRAN.....	48

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Kategori coklat berdasarkan komposisinya	14
4.1 Konsentrasi teobromin dalam plasma selama 24 jam setelah konsumsi <i>dark chocolate bar</i>	33



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Struktur kimia teobromin.....	16
2.2 Jalur biosintesis teobromin	18
2.3 Kerangka konseptual	20
3.1 Grafik konsentrasi obat per satuan waktu.....	26
3.2 Skema rancangan penelitian	28
3.3 Skema alur penelitian	31
4.1 Grafik hasil uji HPLC kandungan teobromin dalam <i>dark chocolate bar</i>	32
4.2 Grafik konsentrasi teobromin dalam plasma selama 24 jam setelah konsumsi <i>dark chocolate bar</i>	34
4.3 Grafik <i>Area Under Curve</i> (AUC) konsentrasiteobromin dalam plasma selama 24 jam ($AUC_{0\rightarrow 24}$) setelah konsumsi <i>dark chocolate bar</i>	35
4.4 Grafik imajiner <i>Area Under Curve</i> (AUC) konsentrasi teobromin dalam plasma selama 24 jam ($AUC_{0\rightarrow 24}$) setelah injeksi teobromin	36

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. <i>Ethical Clearance</i>	48
B. Lembar <i>Informed Consent</i> dan Lembar Pertanyaan	50
B.1 Lembar <i>Informed Consent</i>	50
B.2 Lembar Pertanyaan Kepada Calon Sukarelawan	53
C. Foto Penelitian	54
D. Hasil Uji HPLC.....	61
E. Karakteristik Sukarelawan	68
F. Analisis Data	69
F.1 Koreksi Data Konsentrasi Teobromin pada Sukarelawan A	69
F.2 Koreksi Data Konsentrasi Teobromin pada Sukarelawan B	70
F.3 Koreksi Data Konsentrasi Teobromin pada Sukarelawan C	72
F.4 Analisis T_{\max} , C_{\max} , dan $T^{1/2}$	73

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Cokelat berasal dari tanaman kakao, dengan spesies *Theobroma cacao*. Tanaman kakao ini banyak ditanam pada perkebunan di Indonesia dan luas area perkebunan kakao cenderung meningkat dari tahun ke tahun. Pada tahun 2013, luas perkebunan kakao di Indonesia adalah 1.852.944 ha, meningkat 4,42% dari tahun 2012 (Direktorat Jenderal Perkebunan, 2014). Begitu pula dengan produksi kakao nasional di Indonesia pada tahun 2013 mencapai angka 880.000 ton, meningkat 30.000 ton dari tahun 2012. Pada tahun 2012/2013, konsumsi pengolahan kakao di Indonesia mencapai 255.000 ton, menjadikan Indonesia berada di posisi kedua setelah Malaysia di lingkup Asia dan Oseania (*International Cocoa Organization*, 2013). Sedangkan untuk konsumsi cokelat, salah satu produk olahan kakao, juga mengalami peningkatan. Walaupun konsumsi cokelat di Indonesia berfluktuasi dari tahun 1982 hingga 2008, namun konsumsi tersebut menunjukkan peningkatan sebesar 35,71% (Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia, 2015). Begitu pula dengan studi epidemiologi dari survei yang dilakukan pada masyarakat pedesaan dan perkotaan oleh Badan Pusat Statistik Indonesia pada tahun 2011, dari 49,45% pengeluaran per kapita sebulan untuk bahan makanan, 0,009% digunakan untuk membeli cokelat (Badan Pusat Statistik, 2011). Hal ini menunjukkan bahwa perkebunan, produksi, dan konsumsi kakao dan cokelat di Indonesia sedang berkembang dan memiliki kecenderungan untuk meningkat (Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia, 2015).

Cokelat yang dikonsumsi sehari-hari memiliki kandungan yang beragam, antara lain protein, lemak, karbohidrat, senyawa polifenol, flavonoid serta metilxantin (Rodriguez-Mateos *et al.*, 2012). Senyawa polifenol, flavonoid, serta metilxantin merupakan tiga senyawa utama dalam cokelat (Meng *et al.*, 2009). Metilxantin merupakan derivat xantin yang mengandung gugus metil, yang termasuk di dalamnya

adalah kafein, teobromin, dan teofilin. Metilxantin yang banyak terkandung dalam cokelat adalah teobromin, diikuti dengan kafein. Kandungan teobromin dalam cokelat beragam. Hal ini dipengaruhi oleh kondisi tanaman kakao tersebut seperti sumber biji kakao (kondisi tumbuhan dan varietas tanaman), proses fermentasi dan pengeringan, sampai pembuatan cokelat, serta jenis produksi cokelat, yaitu *dark chocolate*, *milk chocolate*, dan *white chocolate*. Pada *dark chocolate*, mengandung sedikitnya 15% sampai 60% kakao, dan sisanya adalah *cocoa butter*, gula, dan zat aditif. Sehingga kandungan teobromin pada *dark chocolate* paling tinggi di antara tiga jenis cokelat yang lain, yaitu $883,11 \pm 3,54$ mg/100 gram cokelat (Meng *et al.*, 2009).

Teobromin merupakan senyawa aktif yang terkandung dalam cokelat, yang memiliki efek lebih lemah daripada kafein. Teobromin mempunyai efek diuretik yang lemah, relaksasi otot polos bronkus, serta stimulan yang lemah (Kasabe *et al.*, 2010). Teobromin juga diketahui sebagai senyawa psikoaktif yang dapat menimbulkan berbagai efek pada psikis bergantung pada besarnya dosis teobromin yang dikonsumsi. Saat dosis teobromin ditingkatkan, maka menghasilkan efek negatif, seperti perasaan tidak suka dan disforia, terutama pada konsumsi 1000 mg kapsul teobromin secara oral (Baggott *et al.*, 2013). Pada dosis tersebut pula, teobromin menimbulkan suatu efek samping, yaitu efek laksatif (van den Bogaard *et al.*, 2010). Penelitian yang sudah ada juga mengungkapkan adanya efek samping konsumsi cokelat akibat adanya kandungan teobromin di dalamnya, yaitu *heart burn* (Latif *et al.*, 2013).

Efek obat terhadap tubuh, baik efek terapi maupun efek toksik, bergantung pada kadar obat di tempat reseptor atau tempat kerjanya. Pada kebanyakan obat, terdapat hubungan linear antara efek farmakologi obat dengan kadarnya dalam plasma atau serum. Kadar obat dalam plasma ditentukan tidak hanya oleh dosis obat, tetapi juga oleh faktor-faktor farmakokinetik yang ternyata sangat bervariasi antar individu (Setiawati *et al.*, 2012).

Tahapan farmakokinetik obat yang pertama setelah obat tersebut dikonsumsi adalah absorpsi. Besarnya absorpsi obat tersebut diukur dengan parameter bioavailabilitas yang menunjukkan fraksi dari dosis obat yang mencapai peredaran darah sistemik dalam bentuk aktif (Setiawati *et al.*, 2012). Selanjutnya, obat akan mengalami proses distribusi. Besarnya distribusi obat dalam tubuh dapat digambarkan melalui indikator volume distribusi. Bioavailabilitas relatif dan volume distribusi teobromin berturut-turut adalah 80% dan 0,76 L/kg (Shively *et al.*, 1985). Data tersebut penting untuk obat yang memperlihatkan batas keamanan sempit, artinya telah menimbulkan efek toksik pada kadar yang sedikit lebih tinggi dari kadar yang menimbulkan efek terapi (Setiawati *et al.*, 2012). Meski teobromin telah diketahui memiliki efek yang lebih lemah daripada kafein, namun konsumsi dan penggunaan cokelat, yang merupakan sumber teobromin terbesar, secara luas, bebas, dan tanpa aturan tertentu perlu mendapat perhatian (Kasabe *et al.*, 2010).

Melalui uraian yang telah dipaparkan, cokelat merupakan salah satu makanan yang banyak diminati masyarakat dan senyawa aktif tertinggi di dalamnya adalah teobromin, pada *dark chocolate* kandungannya mencapai 800 mg/100 gram. Teobromin sendiri mempunyai efek yang beragam pada tubuh meski relatif lemah. Hal ini menarik peneliti untuk melakukan penelitian tentang parameter farmakokinetik teobromin setelah konsumsi cokelat, terutama bioavailabilitas dan volume distribusi teobromin setelah konsumsi *dark chocolate bar* secara oral yang akan diberikan kepada sukarelawan sehat, sehingga dapat diketahui keamanan cokelat yang dikonsumsi.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang sudah diuraikan sebelumnya, pertanyaan penelitian yang dapat diajukan adalah sebagai berikut.

- a. Bagaimana bioavailabilitas teobromin setelah pemberian *dark chocolate bar* pada sukarelawan sehat?

- b. Bagaimana volume distribusi teobromin setelah pemberian *dark chocolate bar* pada sukarelawan sehat?
- c. Apakah dosis coklat yang dikonsumsi masih dalam batas aman?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan umum dari penelitian ini adalah mengetahui parameter farmakokinetik teobromin setelah pemberian *dark chocolate bar* pada sukarelawan sehat.

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah:

- a. mengetahui bioavailabilitas teobromin setelah konsumsi *dark chocolate bar* secara per oral,
- b. mengetahui volume distribusi teobromin setelah konsumsi *dark chocolate bar* secara per oral,
- c. mengetahui batas konsumsi *dark chocolate bar* sehingga tidak menimbulkan efek toksik.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberi manfaat sebagai berikut:

- a. bagi peneliti
penelitian ini dilakukan untuk menambah wawasan peneliti dalam bidang farmakokinetik klinik terutama tentang bioavailabilitas dan volume distribusi teobromin setelah pemberian *dark chocolate bar* pada sukarelawan dan diharapkan dapat mengimplementasikannya dalam zat atau obat yang lain saat berada dalam klinik,
- b. bagi institusi
hasil dari penelitian ini diharapkan dapat mendukung pencapaian visi, misi, dan tujuan dari Fakultas Kedokteran Universitas Jember,
- c. bagi ilmu pengetahuan
hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi yang berguna mengenai farmakokinetik klinik teobromin setelah konsumsi *dark chocolate*

bar per oral terutama dalam bidang pertanian dan pengolahan pangan sehingga bisa menghasilkan produk cokelat dalam batas aman serta ilmu farmakokinetik ini dapat diimplementasikan pada bidang farmakologi forensik dalam menentukan kadar suatu zat lain dalam darah,

d. bagi masyarakat

hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi masukan kepada masyarakat mengenai dosis atau batas konsumsi *dark chocolate bar* sehubungan dengan bioavailabilitas dan volume distribusi teobromin dalam tubuh setelah mengonsumsi jenis cokelat tersebut sehingga bermanfaat bagi kesehatan tubuh.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Cokelat

2.1.1 *Theobroma cacao*

Tanaman kakao yang dikomersilkan adalah spesies *Theobroma cacao* L. Sistematika kakao menurut Tjitrosoepomo dalam Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia (2015) adalah sebagai berikut.

Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Subdivisi	: <i>Angiospermae</i>
Kelas	: <i>Dicotyledoneae</i>
Subkelas	: <i>Dialypetalae</i>
Ordo	: <i>Malvales</i>
Famili	: <i>Sterculiaceae</i>
Genus	: <i>Theobroma</i>
Spesies	: <i>Theobroma cacao</i> Linneaus

Warna buah tanaman kakao sangat beragam, tetapi pada dasarnya hanya ada dua macam warna. Buah yang ketika muda berwarna hijau atau hijau agak putih jika sudah masak akan berwarna kuning. Sementara itu, buah yang ketika muda berwarna merah, setelah masak berwarna jingga. Kulit buah memiliki 10 alur dalam dan dangkal silih berganti (Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia, 2015).

Buah tanaman kakao mengandung purin alkaloid, antara lain 1-metilxantin, 3-metilxantin, 7-metilxantosin, 7-metilxantin, teofilin, paraxantin, teobromin, dan kafein. Konsentrasi tertinggi purin alkaloid pada tanaman kakao ini ditemukan pada bijinya (kotiledon dan lokus embrional). Kandungan purin alkaloid yang tertinggi yaitu teobromin dengan kadar 22 $\mu\text{mol}/\text{gram}$ berat bersih, selanjutnya adalah kafein dengan kadar 4,9 $\mu\text{mol}/\text{gram}$ berat bersih (Zheng *et al.*, 2004).

2.1.2 Kakao dalam Dunia Kesehatan

a. Kakao untuk Kesehatan sistem kardiovaskuler

Berbagai penelitian berupaya membuktikan kegunaan kakao tersebut dan menemukan bahwa kakao dapat membantu menjaga kesehatan sistem peredaran darah. Efek konsumsi kakao dalam bentuk cokelat batangan atau minuman cokelat antara lain memperbaiki komposisi kolesterol darah, menurunkan tekanan darah, menekan aktivasi keping darah, dan meningkatkan respon jaringan endotelium pembuluh darah. Sistem peredaran darah yang baik dapat menurunkan risiko aterosklerosis, penyumbatan pembuluh darah, dan mencegah terjadinya gangguan fungsi jantung.

1) Kakao dan komposisi kolesterol darah

Konsumsi kakao bubuk sebanyak 26 g/hari selama 4 minggu dapat meningkatkan konsentrasi kolesterol HDL (High Density Lipoprotein), menurunkan dan menekan konsentrasi oksidasi kolesterol LDL (Low Density Lipoprotein) (Baba *et al.*, 2007).

2) Kakao dan tekanan darah

Produk kakao dalam bentuk cokelat dan minuman telah dibuktikan mampu menurunkan tekanan darah orang dewasa normal serta pasien prehipertensi atau hipertensi tahap 1. Secara umum, produk kakao dapat membantu menurunkan tekanan darah sistolik hingga 4,5 mmHg, dan tekanan darah diastoliknya hingga 2,3 mmHg (Desch *et al.*, 2009).

Efek penurunan tekanan darah telah diteliti setelah mengonsumsi satu *dark chocolate bar* selama 15 hari, menurunkan tekanan darah sistolik pada sukarelawan sehat, begitu pula pada orang muda dan tua yang menderita hipertensi. Mekanisme yang tepat sehingga cokelat bisa menurunkan tekanan darah belum diketahui secara pasti, diduga karena keterlibatan peningkatan bioavailabilitas nitrit oksida (NO), induksi flavonol yang menghambat *angiotensin converting enzyme* (ACE), serta basis asam stearat dapat menurunkan tekanan darah diastolik (Latif, 2103). Kandungan metilxantin yang

tinggi, terutama teobromin, turut serta menimbulkan efek penurunan tekanan darah dengan menurunkan sentral dan sistemik hemodinamik (van den Bogaard *et al.*, 2010).

3) Kakao dan keping darah (trombosit)

Penelitian melaporkan bahwa meminum minuman kakao dapat menekan aktivasi trombosit, dengan cara menurunkan tingkat ekspresi glikoprotein IIb-IIIa, hal ini khususnya terlihat 6 jam pasca konsumsi. Ditenggarai, polifenol dalam kakao merupakan senyawa yang memicu perubahan aktivitas trombosit (Murphy *et al.*, 2003).

4) Kakao dan fungsi jaringan endotelium

Orang yang mengonsumsi kakao, khususnya yang tanpa gula, diteliti mempunyai respon vasodilatasi yang lebih baik. Studi menunjukkan bahwa kandungan flavonol yang tinggi merangsang nitrit oksida pada pembuluh darah sehingga menyebabkan vasodilatasi pembuluh darah (Latif, 2013). Hal ini mengidentifikasi bahwa kakao dapat meningkatkan fungsi jaringan endotelium (Heiss *et al.*, 2005; Faridi *et al.*, 2008).

b. Kakao untuk kesehatan saluran pernafasan

Kandungan teobromin dalam kakao diyakini dapat meredam batuk. Hal ini sebagaimana dilaporkan oleh Usmani *et al.* (2005), bahwa teobromin dapat mengurangi batuk pada marmot yang diinduksi dengan asam sitrat dan pada manusia yang diinduksi kapsaikin (senyawa aktif dalam cabai dan merica yang dapat memicu batuk). Teobromin mencegah depolarisasi sel saraf vagus sehingga tidak terjadi batuk walau telah di induksi oleh kapsaikin. Terkait dengan pengobatan terhadap asma, kakao mengandung teofilin yang juga merupakan penghambat enzim fosfodiesterase (*Phosphodiesterase, PDE*). Enzim fosfodiesterase menyebabkan terjadinya penyempitan saluran bronkus, terhambatnya kerja enzim ini dapat memicu pelebaran bronkus dan memudahkan jalannya udara di saluran pernafasan (Bozwell-Smith *et al.*, 2006).

c. Kakao untuk kesehatan gigi, mulut dan saluran pencernaan

1) Kakao untuk kesehatan gigi dan mulut

Sebuah penelitian oleh Ruenis *et al.* (2000) melaporkan bahwa kafein dapat memicu timbulnya luka pada dinding mulut, sementara teofilin dapat memicu terbentuknya lubang pada gigi. Penelitian selanjutnya menemukan bahwa kejadian gigi berlubang pada orang dewasa erat kaitannya dengan kebiasaan konsumsi, minuman berkafein (Majewski, 2001).

Kendati kakao mengandung kafein dan teofilin, kakao tidak lantas dianggap sebagai bahan penyebab gigi berlubang. Penelitian oleh Amaechi *et al.* (2013) melaporkan bahwa teobromin meningkatkan pembentukan mineral pada gigi yang rusak. Efek yang ditunjukkan teobromin setara dengan pasta gigi komersial. Penggunaan teobromin juga menghambat pelepasan mineral dan membuat gigi lebih keras. Polifenol dalam kakao juga bermanfaat dalam menjaga kesehatan mulut dari dampak negatif bakteri *Streptococcus mutans* dan *Streptococcus sanguinis*. Kedua jenis bakteri ini erat kaitannya dengan risiko gigi berlubang (Ge *et al.*, 2008).

2) Kakao dan lambung

Cokelat dapat menyebabkan *heart burn* atau rasa panas pada dada. Hal ini karena salah satu dari kandungan cokelat, yaitu teobromin, dapat merelaksasi otot sfingter esofagus, yang menyebabkan asam lambung dapat masuk atau *reflux* ke dalam esofagus dan menyebabkan rasa panas pada dada (Latif *et al.*, 2013).

3) Kakao dan biota usus

Polifenol dalam kakao dapat diserap dan bertahan di saluran pencernaan. Lebih jauh, polifenol kakao diketahui mempengaruhi komposisi mikrobiota usus dengan cara meningkatkan populasi bifidaobakteria dan laktobasilus, sekaligus menurunkan populasi klostridium (Tzounis *et al.*, 2011). Hubungan antara polifenol dengan mikrobiota usus terjadi secara timbal balik. Mikrobiota memengaruhi hidrolisis dan absorpsi polifenol dalam saluran pencernaan. Produk

hidrolisis itu sendiri membawa dampak pada perkembangan populasi mikrobiota usus (Hayek, 2013).

d. Kakao untuk kesehatan dan kinerja otak

Konsumsi coklat erat kaitannya dengan tingkat kecerdasan. Sejumlah penelitian mendukung keterkaitan antara kakao, coklat dan kinerja otak.

1) Kakao dan kecerdasan

Peningkatan fungsi kognitif, dalam hal tingkat kesiagaan (*alertness*) dan pemrosesan informasi visual (*rapid visual information processing*) dilaporkan meningkat setelah konsumsi produk kakao (Smit *et al.*, 2004). Fungsi kognitif yang lebih baik juga ditemukan pada orang lanjut usia yang biasa mengonsumsi coklat dibandingkan dengan yang tidak mengonsumsi coklat (Nurk *et al.*, 2009). Kelompok lansia yang mengalami penurunan kognitif ringan yang antara lain ditandai dengan berkurangnya daya ingat, juga mengalami perbaikan kognisi setelah meminum minuman kakao selama delapan minggu. Konsumsi coklat dapat meningkatkan aliran darah otak sehingga coklat dapat berperan serta dalam terapi pencegahan stroke dan demensia (Latif, 2013).

2) Kakao dan emosi

Konsumsi produk kakao menyebabkan responden menjadi lebih bersemangat (energik, siaga) dan lebih bahagia (senang, tenteram, tenang) (Smith *et al.*, 2004). Konsumsi coklat menimbulkan efek antistres karena pada coklat terdapat beberapa komponen bioaktif yang dapat meningkatkan kewaspadaan. Studi menunjukkan bahwa konsumsi *dark chocolate bar* selama 14 hari dapat menurunkan profil ansietas. Efek ini diduga karena coklat merangsang produksi serotonin yang merupakan neurotransmitter penenang (Latif, 2013). Selain itu, keluhan kelelahan secara mental juga berkurang. Dalam tiga hari, konsumsi coklat sudah dapat meningkatkan kualitas hidup sekaligus menurunkan tingkat depresi dan kegelisahan pasien kanker (Scholey *et al.*, 2010).

Para peneliti selanjutnya menelaah bahwa terdapat dua senyawa dalam kakao yang berpengaruh terhadap aktivitas otak, yakni polifenol dan metilxantin. Studi

terhadap beberapa tingkatan konsentrasi polifenol dalam minuman kakao menunjukkan bahwa kadar flavanol lebih dari 520 mg per sajian membantu fungsi kognisi dan emosi menjadi lebih baik (Desideri *et al.*, 2012). Senyawa metilxantin dalam kakao yaitu teobromin dan kafein juga diyakini dapat membuat orang menjadi lebih responsif dan bergairah, terlihat setelah konsumsi cokelat yang mengandung 20 mg kafein dan 250 mg teobromin (Smit *et al.*, 2004).

e. Kakao untuk Sistem Tubuh yang Lain

Kakao juga mempunyai efek bagi sistem tubuh yang lain, antara lain adalah sebagai berikut.

- 1) Efek antidiabetik, karena kadar flavonol yang tinggi pada kakao. Kadar flavonol yang tinggi ini menyebabkan aktivasi NO sehingga bioavailabilitasnya dalam darah meningkat. Peningkatan bioavailabilitas NO ini dapat menurunkan resistensi insulin.
- 2) Mengurangi gejala *pre menstrual syndrome* (PMS), seperti *breast-swelling* dan *tenderness*, merasa lelah, kram, kembung, konstipasi, diare, sakit kepala, sakit punggung, perubahan nafsu makan, sakit otot atau sendi, masalah konsentrasi dan mengingat, *moodswing*, dan *anxiety*. Hal ini karena cokelat mengandung karbohidrat kompleks, *flavonoid polyphenol*, vitamin B6, asam lemak tidak jenuh, dan mineral (magnesium, kalsium, dan zat besi) yang berpengaruh dalam mengatur gejala premenstrual pada siklus menstruasi dengan cara menyeimbangkan kadar hormon estrogen dan progesteron dalam darah selama fase luteal dalam siklus menstruasi (Nurazizah *et al.*, 2015).
- 3) Efek antiobesitas, karena konsumsi kakao selama tiga minggu dapat menurunkan berat badan total, berat jaringan adiposa putih mesenterika, serta serum trigliserida pada tikus (Latif, 2013).
- 4) Efek antitumor pada studi *in vitro* sebelumnya menunjukkan cokelat dapat menurunkan pertumbuhan sel kanker. Namun di beberapa studi yang lain,

cokelat justru dapat mempermudah perkembangan sel tumor atau kanker (Latif, 2013).

- 5) Efek antiinflamasi timbul karena cokelat menghambat jalur lipooksigenase, dengan cara berikatan langsung pada *active sites* dari enzim lipooksigenase (Latif, 2013).
- 6) Pada proses pemulihan setelah latihan dengan penambahan suplementasi cokelat menjadi lebih cepat, baik dalam pemulihan perubahan fisiologi maupun metabolik. Hal ini disebabkan karena kadar glukosa dalam plasma meningkat secara signifikan pada 15 menit setelah konsumsi cokelat dan kadarnya tetap tinggi hingga 30 menit setelah satu jam berlari (Latif, 2013).

2.1.3 Kakao untuk Produk Pangan

Masyarakat mengolah biji kakao menjadi kembang gula, makanan, minuman bahkan masakan. Olahan dari kakao salah satunya adalah cokelat. Cokelat diperoleh dari pasta kakao yang diproses melalui pencampuran dengan gula dan susu, penghalusan dan diikuti dengan pencetakan. Berkembangnya teknik pengolahan kakao menjadi cokelat lantas memicu tumbuhnya industri-industri cokelat (Pusat Penelitian Kopi dan Kakao, 2015). Kini cokelat dipasarkan dalam berbagai bentuk, campuran dan tingkat kemanisan, antara lain sebagai berikut.

a. *Milk* dan *white chocolate*

Komposisi kakao yang digunakan dalam pembuatan cokelat menentukan kategori cokelat (lihat Tabel 2.1). Cokelat dengan proporsi pasta kakao kurang dari 35% dinamakan *sweet chocolate*. Apabila cokelat menggunakan pasta kakao kurang dari 15% dan susu lebih dari 12% maka dinamakan *milk chocolate*. Istilah *white chocolate* diberikan pada campuran lemak kakao dengan pemanis dan susu, tanpa adanya kandungan pasta kakao dan bubuk kakao.

b. *Dark chocolate*

Dark chocolate adalah cokelat yang hanya mempunyai dua komposisi vital, yaitu *cocoa liquor* (pasta) dan gula, dengan kandungan *cocoa liquor* 75%. Pasta adalah

yang kita dapatkan saat kita mengambil daging biji kakao tanpa kulit (nib) dan menggilingnya dalam air. Setelah beberapa saat, maka akan terbentuk dua komponen yang berbeda. Komponen yang pertama, yang kecil, yang merupakan serbuk partikel yang polar, yang memberi rasa pada coklat. Sedangkan komponen yang kedua, yang putih, adalah lapisan lipid yang non polar, yang memberi struktur pada coklat. Komponen ini dikenal dengan *cocoa butter* atau lemak kakao (Owen, 2013).

- c. *Couverture* adalah coklat dengan kandungan lemak kakao yang tinggi. Suatu *couverture* harus memiliki setidaknya 31% lemak kakao. Umumnya, *couverture* digunakan dalam dunia kuliner sebagai coklat pelapis dan hiasan.
- d. *Ganache* adalah campuran coklat dengan krim, yang dibuat dengan menuangkan coklat keatas krim yang mendidih, lalu diaduk dengan cepat. *Ganache* biasanya digunakan untuk isian coklat *praline* dan *truffle*.
- e. *Gianduja* adalah coklat dengan campuran kacang di dalamnya. Kacang yang digunakan harus memiliki tingkat kehalusan tinggi sehingga menyerupai pasta. Jenis kacang yang digunakan umumnya adalah kacang almond atau kacang hazel dengan konsentrasi antara 20%-40%.
- f. *Fondue* coklat merupakan hidangan penutup berupa aneka potongan buah untuk dicelupkan ke dalam semangkuk coklat panas. Cara penyajian coklat untuk *fondue* kemudian dikembangkan secara kreatif dengan menggunakan alat tertentu sehingga coklat dapat mengalir seperti air mancur, hal ini dinamakan *fondue fountain*.

Tabel 2.1 Kategori coklat berdasarkan komposisinya

Komposisi	Sweet chocolate	Dark chocolate (bittersweet)	Milk chocolate	White chocolate
Pemanis	Diizinkan	Diizinkan	Diizinkan	Maks 55%
Pasta kakao	Min 15%	Min 35%	Min 10%	Tidak ditentukan
Lemak kakao	Min 18%	Min 18%	Min 15%	Min 20%
Susu	<5%;<12%	<5%;<12%	Min 12%	Min 14%
Perisa	Dilarang	Dilarang	Dilarang	Dilarang
Lemak nabati	Maks 5%	Maks 5%	Maks 5%	Maks 5%
	Dilarang	Dilarang	Dilarang	Dilarang

2.2 Parameter Farmakokinetik

2.2.1 Bioavailabilitas

Bioavailabilitas merupakan salah satu parameter farmakokinetik. Parameter ini menunjukkan fraksi dari dosis yang mencapai peredaran darah sistemik dalam bentuk aktif. Jika obat dalam bentuk aktif diberikan secara i.v maka $F=1$ (Setiawati, 2012).

Jika obat diberikan secara oral maka F biasanya kurang dari 1 dan besarnya bergantung pada jumlah obat yang dapat menembus dinding saluran cerna (jumlah obat yang di absorpsi) dan jumlah obat yang mengalami eliminasi presistemik (metabolisme lintas pertama) di mukosa usus dan dalam hepar (Setiawati, 2012). Jumlah obat yang mengalami absorpsi maupun eliminasi lintas pertama ini ditentukan oleh suatu tingkatan, yaitu tingkatan absorpsi (k_a) dan tingkatan eliminasi (k) (Shargel *et al.*, 2007).

Besarnya bioavailabilitas suatu obat oral digambarkan oleh AUC (*area under curve* atau luas area dibawah kurva kadar obat dalam plasma terhadap waktu), obat oral tersebut dibandingkan dengan AUC yang diberikan secara i.v. ini disebut bioavailabilitas oral dan merupakan bioavailabilitas absolut dari obat oral tersebut. AUC adalah permukaan di bawah kurva (grafik) yang menggambarkan naik turunnya

kadar plasma sebagai fungsi dari waktu. AUC dapat dihitung secara matematis dan merupakan ukuran untuk bioavailabilitas suatu obat (Setiawati, 2012).

Bioavailabilitas obat-obat yang diberikan secara oral mungkin kurang dari 100%. Hal ini disebabkan oleh dua alasan utama yaitu:

a. Tingkat absorpsi

Setelah pemberian oral, suatu obat dapat diabsorpsi secara tidak lengkap. Hal ini disebabkan terutama oleh kurangnya absorpsi melalui usus.

b. Eliminasi *first-pass*

Setelah absorpsi melalui dinding usus, darah portal akan membawa obat ke hati sebelum masuk ke dalam sirkulasi sistemik. Obat dapat dimetabolisme di dinding usus atau bahkan di dalam darah portal, tetapi umumnya hati adalah alat yang bertanggung jawab atas metabolisme obat sebelum obat mencapai sirkulasi sistemik. Selain itu, hati dapat mengeluarkan obat ke dalam empedu. Setiap proses ini dapat berperan pada pengurangan bioavailabilitas.

2.2.2 Volume Distribusi

Volume distribusi (V_d) merupakan salah satu parameter farmakokinetik. Parameter ini menunjukkan volume penyebaran obat dalam tubuh dengan kadar plasma atau serum. V_d bukanlah volume anatomis yang sebenarnya, tetapi hanyalah volume semu yang menggambarkan luasnya distribusi obat dalam tubuh. Tubuh dianggap sebagai satu kompartemen yang terdiri dari plasma atau serum dan V_d adalah jumlah obat dalam tubuh dibagi dengan kadarnya dalam plasma atau serum (Setiawati *et al.*, 2012).

Besarnya V_d ditentukan oleh ukuran dan komposisi tubuh, kemampuan molekul obat memasuki berbagai kompartemen tubuh, dan derajat ikatan obat dengan protein plasma dan berbagai jaringan. Obat yang tertimbun dalam jaringan sehingga kadarnya dalam plasma rendah sekali mempunyai V_d yang besar sekali. Sementara

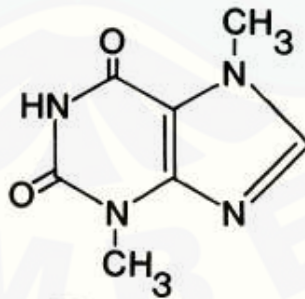
obat yang terikat kuat pada protein plasma sehingga kadarnya dalam plasma cukup tinggi mempunyai V_d yang kecil (Setiawati *et al.*, 2012).

Volume distribusi biasanya dihitung untuk pasien tertentu dengan menggunakan berat. Jika pada pasien yang gemuk, volume distribusi obat-obat tidak menembus lemak, jadi perhitungan volume distribusi harus dipikirkan lagi. Begitu pula pada pasien dengan edema, asites, atau efusi pleura. Mereka memiliki volume distribusi besar untuk obat-obat tertentu, seperti antibiotik golongan aminoglikosida (Katzung, 2009).

2.3 Teobromin

2.3.1 Biosintesis Teobromin

Teobromin merupakan metabolit sekunder golongan alkaloid. Definisi alkaloid adalah senyawa organik siklik yang mengandung unsur N dengan tingkat oksidasi negatif. Teobromin mempunyai formula kimia yaitu $C_7H_8N_4O_2$. Teobromin pada kakao merupakan hasil sintesis dari alkaloid golongan purin. Senyawa alkaloid purin diduga dibentuk dari hidrolisis nukleotida purin dengan beberapa modifikasi kerangka purin setelahnya. Purin merupakan kerangka hetrosiklik N yang termasuk pada basa nukleotida adenin dan guanin yang menyusun DNA dan RNA (Pusat Penelitian Kopi dan Kakao, 2015).

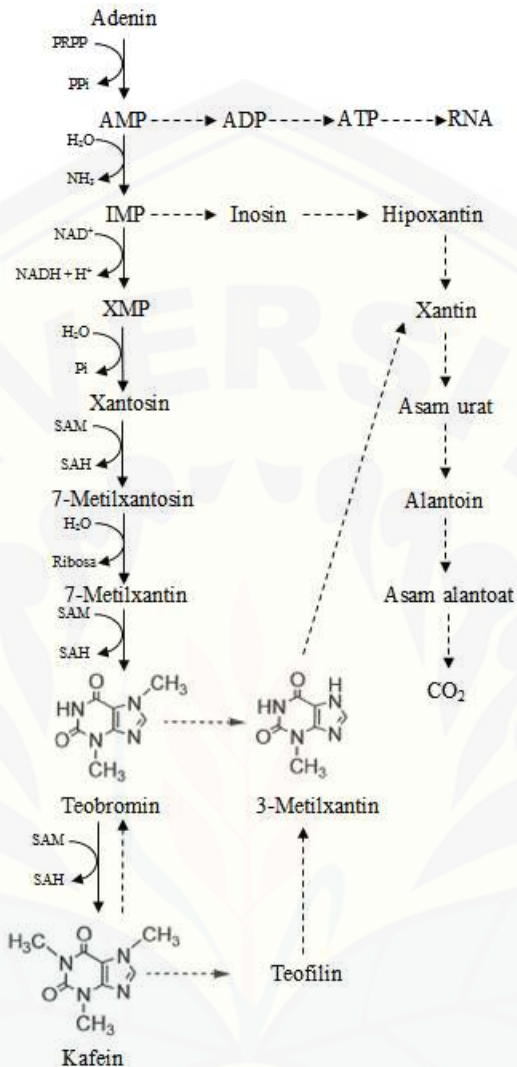


Gambar 2.1 Struktur kimia teobromin (Lelo *et al.*, 1986)

Teobromin, bersama dengan kafein dan teofilin, merupakan derivat xantin ialah alkaloid yang terdapat pada tumbuh-tumbuhan. Ketiganya merupakan derivat xantin yang mengandung gugus metil. Xantin sendiri adalah dioksimurin yang mempunyai struktur mirip dengan asam urat (Louisa, 2012).

Biosintesis teobromin ini terutama terjadi pada tanaman kakao. Adenin adalah prekursor dari sintesis purin alkaloid. Dari adenin ini, akan terjadi tiga rute metabolik, yaitu: (i) sintesis purin alkaloid, (ii) sintesis RNA, dan (iii) katabolisme purin (Zheng *et al.*, 2004).

Metabolisme adenin dimulai dari pembentukan AMP yang dikatalisasi oleh adenin fosforibosiltransferase. Dalam biosintesis purin alkaloid, AMP dikonversi menjadi *xanthosine-5'-monophosphate* (XMP) melalui *inosine-5'-monophosphate* oleh AMP deaminase dan IMP dehidrogenase. Xantosin terbentuk dari XMP oleh 5'-nukleotidase dan berperan utama dalam jalur purin alkaloid, yaitu: xantosin → 7-*methylxanthosine* → 7-*methylxanthine* → teobromin → kafein (lihat Gambar 2.2). Sedangkan untuk sintesis RNA, AMP difosforilasi menjadi ATP melalui ADP dan akhirnya digunakan. Fraksi dari AMP terdegradasi melalui IMP dan asam urat (alantoin dan asam alantoat) menjadi CO₂ (Zheng *et al.*, 2004).



Gambar 2.2 Jalur biosintesis teobromin (Zheng *et al.*, 2004)

2.3.2 Efek Teobromin

Teobromin mempunyai efek pada sistem saraf pusat. Senyawa metilxantin merupakan antagonis selektif reseptor A₁-adenosin. Adenosin adalah molekul yang berikatan dengan reseptor adenosin dan menyebabkan timbulnya relaksasi. Pengaruh terikatnya adenosin dan reseptornya yang paling nyata adalah timbulnya rasa kantuk (Huang *et al.*, 2011). Teobromin, sama halnya dengan kafein, juga berikatan dengan

reseptor adenosin tanpa menimbulkan efek yang sama dengan adenosin. Terikatnya reseptor adenosin dengan metilxantin menyebabkan terhalangnya kinerja adenosin dan tertundanya rasa kantuk (Ribeiro *et al.*, 2010). Efek yang ditimbulkan teobromin pada saraf pusat adalah *dose dependent*. Konsumsi teobromin dengan dosis rendah mampu menimbulkan efek yang positif. Namun konsumsi teobromin kadar tinggi berakibat timbulnya efek yang negatif. Terapi teobromin dengan dosis 250 mg mampu meningkatkan secara signifikan keinginan untuk menjalani terapi teobromin lagi. Sedangkan konsumsi teobromin pada kadar 1000 mg mampu menurunkan kewaspadaan (Baggott *et al.*, 2013).

Teobromin, bersama kafein dapat bertindak sebagai antioksidan. Teobromin menetralkan radikal hidroksil, peroksil, dan oksigen tunggal, sehingga dapat disejajarkan dengan antioksidan lainnya seperti glutathione dan asam askorbat. Meski begitu, kemampuan teobromin lebih rendah daripada polifenol (Maleyki, 2010).

Teobromin telah menunjukkan penekanan terhadap efek inhibisi aktivitas parasimpatis dan merupakan antagonis selektif reseptor A₁-adenosin. Mekanisme ini menjelaskan terjadinya peningkatan denyut nadi tanpa disertai perubahan *cardiac output* dan *stroke volume* (van den Bogaard *et al.*, 2010). Teobromin juga mempunyai efek vasodilatasi endotelium dengan cara menghambat penguraian cAMP pada otot polos arterial (van den Bogaard *et al.*, 2010).

Terapi dengan kakao yang diperkaya dengan teobromin sehingga kadarnya mencapai 979 mg menimbulkan efek yang tidak menyenangkan. Hal ini disebabkan karena teobromin memberikan efek laksatif. Adenosin dapat menghambat motilitas kolon. Teobromin adalah antagonis reseptor A₁-adenosin, sehingga hambatan pada reseptor adenosin dapat menstimulasi motilitas kolon dan inilah yang menjelaskan efek laksatif dari teobromin (van den Bogaard *et al.*, 2010).

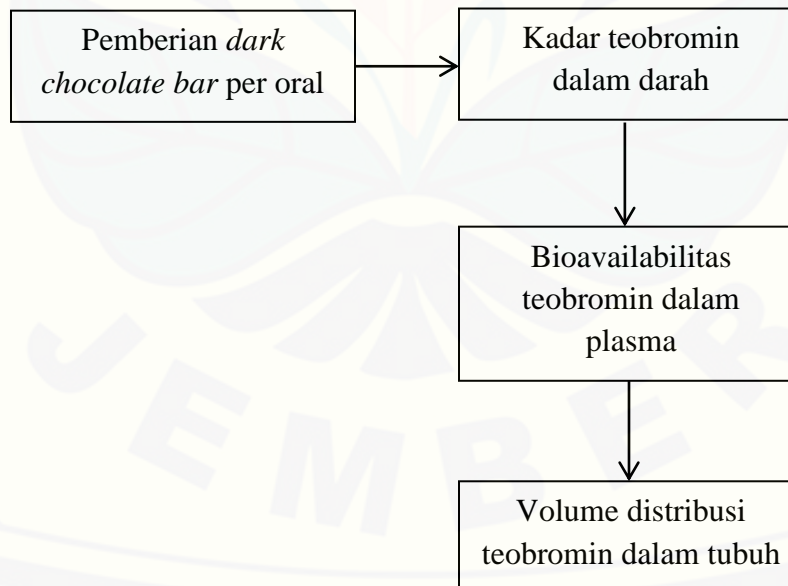
Teobromin dapat menyebabkan *heart burn* atau rasa panas pada dada. Hal ini dikarenakan teobromin dapat merelaksasi otot sfingter esofagus, yang menyebabkan asam lambung dapat masuk atau *reflux* ke dalam esofagus dan menyebabkan rasa panas pada dada (Latif, 2013).

2.3.3 Farmakologi Teobromin

Teobromin diabsorpsi dengan baik pada usus dan mencapai kadar puncaknya dalam plasma dalam dua sampai tiga jam setelah konsumsi per oral (Boggatt *et al*, 2013). Kadar puncak teobromin dalam plasma yang pernah diteliti adalah 6,72 $\mu\text{g/ml}$ setelah konsumsi kapsul teobromin 370 mg, serta 8,05 $\mu\text{g/ml}$ setelah konsumsi permen coklat dengan kandungan 72 mg kafein dan 370 mg teobromin (Mumford *et al.*, 1996).

Pada penelitian lain juga menyebutkan tentang $t^{1/2}$, volume distribusi, dan *clearance* setelah abstinensi dari semua produk yang mengandung metilxantin, terutama teobromin. $t^{1/2}$ dari teobromin adalah 10 jam sejak konsumsi teobromin (Shively *et al.*, 1985) atau 7,2 jam sejak kadar puncak teobromin (Lelo *et al.*, 1986). Volume distribusi teobromin yaitu 0,76 L/kg. *Clearance* setelah abstinensi dari semua produk metilxantin yaitu 0,88 ml/menit/kg (Shively *et al.*, 1985).

2.4 Kerangka Konseptual



Gambar 2.3 Kerangka konseptual

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Pre-Experimental Design* dengan bentuk *One Shot Case Study*. Desain eksperimen ini belum merupakan eksperimen sungguh-sungguh, karena masih terdapat variabel luar yang ikut berpengaruh terhadap terbentuknya variabel dependen. Jadi hasil eksperimen yang merupakan variabel dependen itu bukan semata-mata dipengaruhi oleh variabel independen. Hal ini dapat terjadi karena tidak adanya kelompok kontrol dan sampel tidak dipilih secara random.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Pengambilan sampel penelitian dan preparasi awal sampel dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Pengujian sampel penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia dan Instrumen Fakultas Farmasi Universitas Jember. Penelitian ini dilakukan pada bulan Oktober hingga November 2015.

3.3 Populasi dan Sukarelawan Penelitian

Populasi penelitian adalah sukarelawan yang diambil dari masyarakat umum yang berada dalam lingkup usia dewasa muda. Jumlah sukarelawan pada penelitian ini adalah tiga orang. Sukarelawan pada penelitian ini ditentukan berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi berikut.

3.3.1 Kriteria Inklusi Sukarelawan

- a. usia dewasa muda, yaitu 18-30 tahun. Usia sukarelawan yang digunakan dalam penelitian ini adalah usia dewasa muda mulai dari usia 18 tahun sampai dengan

usia 30 tahun. Karena pada usia tersebut keadaan fisiologis seseorang cenderung lebih baik,

- b. jenis kelamin, yaitu laki-laki. Pada penelitian ini jenis kelamin dibatasi yaitu menggunakan sukarelawan yang berjenis kelamin laki-laki. Karena faktor hormonal tidak terlalu berpengaruh pada laki-laki,
- c. indeks massa tubuh (IMT), yang digunakan pada penelitian ini adalah sekitar 17 sampai 30,
- d. tekanan darah sistolik 90 mmHg sampai dengan 140 mmHg, tekanan darah diastolik 50 mmHg sampai dengan 90 mmHg.

3.3.2 Kriteria Eksklusi Sukarelawan

- a. terdapat riwayat alergi makanan, terutama cokelat,
- b. terdapat riwayat sakit pada sistem kardiovaskular dan respirasi,
- c. terdapat riwayat sakit pada sistem gastrointestinal, maksimal seminggu sebelum dilakukan penelitian atau pengambilan darah/sampel,
- d. terdapat fobia atau ketakutan berlebihan terhadap suntikan atau pengambilan darah,
- e. sedang mengonsumsi obat-obatan pada seminggu sebelum dan hingga dilakukan penelitian atau pengambilan darah/sampel,
- f. mengonsumsi makanan atau minuman yang mengandung derivat xantin (seperti cokelat, kopi, atau teh) selama seminggu sebelum tes dilaksanakan.

3.3.3 Syarat Lain Sukarelawan

- a. Seluruh sukarelawan harus sudah membaca dan mengerti lembar penjelasan kepada calon subjek, lembar instruksi subjek, serta sudah menyetujui *informed consent* yang diberikan harus mematuhi seluruh prosedur penelitian. Pada lembar penjelasan kepada calon subjek dijelaskan tentang kesukarelaan untuk ikut penelitian, prosedur penelitian, kewajiban subjek penelitian, risiko dan efek samping dan penanganannya, manfaat, kerahasiaan, serta kompensasi yang akan

- diberikan selama penelitian berlangsung. Lembar instruksi berisi apa saja yang harus dan tidak boleh dilakukan oleh sukarelawan selama penelitian berlangsung,
- b. sukarelawan yang tidak mengikuti instruksi yang diberikan oleh peneliti atau tidak disiplin akan dikeluarkan dari penelitian.

3.4 Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis *dark chocolate bar* yang diberikan kepada sukarelawan. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah bioavailabilitas dan volume distribusi teobromin pada plasma sukarelawan. Sedangkan variabel kontrol dari penelitian ini adalah kriteria sukarelawan dan analisis sampel kromatografi (*High Performance Liquid Chromatography* atau HPLC).

3.5 Definisi Operasional

3.5.1 *Dark chocolate bar*

Merupakan cokelat yang mengandung sedikitnya 15% sampai 60% kakao, dan sisanya adalah *cocoa butter*, gula, dan zat aditif. *Dark chocolate bar* ini akan dikonsumsi secara per oral dan langsung dimakan sampai habis oleh sukarelawan. *Dark chocolate bar* yang digunakan dalam penelitian ini adalah merk *V.I.C.CO® Dark Chocolate* yang diproduksi pada tanggal 7 September 2015 oleh Pusat Penelitian Kopi dan Kakao dengan netto 70 gram. Cokelat ini didapatkan dari *outlet* Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia di Jember.

3.5.2 Kadar teobromin dalam cokelat

Kadar teobromin dalam cokelat merupakan banyaknya atau dosis teobromin dalam *dark chocolate bar* yang digunakan dalam penelitian ini. Kadar teobromin dalam cokelat ini dihitung menggunakan instrumen uji *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Kadar teobromin dalam cokelat ini akan digunakan untuk menghitung bioavailabilitas teobromin dalam darah.

Metode preparasi bahan sebelum diinjeksikan ke dalam instrumen HPLC adalah sebagai berikut. Sebanyak 20,3 mg batang coklat yang digunakan dalam penelitian ini dihancurkan dan dilarutkan ke dalam 10 ml *aquadest*, kemudian diaduk dengan kecepatan 400 rpm selama 20 menit pada suhu ruangan. Selanjutnya, larutan tersebut dipanaskan dalam suhu 75 °C selama 25 menit, lalu segera didinginkan di dalam lemari es agar tidak ada uap yang terbang. Setelah itu, larutan disaring menggunakan Whatmann *nylon membran* dan siap diinjeksikan ke dalam instrumen HPLC (Caudle *et al.*, 2001).

3.5.3 Kadar teobromin dalam darah

Kadar teobromin dalam darah merupakan besarnya kadar teobromin dalam darah sukarelawan setelah konsumsi *dark chocolate bar*. Pengambilan darah dilakukan pada jam ke 0, 1^{1/2}, 3, 6, 10, dan 24. Pengambilan darah dilakukan dengan cara pungsi vena pada vena mediana cubiti pada jam ke-0, 1^{1/2}, 3, 6, 10, dan 24. Darah yang diambil pada masing-masing waktu sebanyak 3 ml selanjutnya disimpan di dalam *vacuum tube* yang telah berisi antikoagulan heparin. Semua proses pengambilan darah akan dilakukan oleh Tenaga Ahli (Dosen Pembimbing Utama serta Analis Laboratorium). Setelah itu dilakukan pemisahan darah dengan menggunakan *ultra centrifuge* dengan kecepatan 5.000 rpm selama 300 detik yang nanti akan terbentuk dua lapisan yaitu plasma dan sel darah. Plasma ini yang diambil dan disimpan dalam suhu -20 °C hingga tiba saatnya untuk dihitung kadar teobrominnya dengan menggunakan instrumen HPLC.

Metode preparasi plasma sebelum diinjeksikan ke dalam instrumen HPLC adalah sebagai berikut. Plasma yang didapatkan dicampur dengan asam perklorat 20% dengan perbandingan 5:2 (v/v), selanjutnya dihomogenkan dengan *vortex* lalu dilakukan pemisahan dengan *ultra centrifuge* dengan kecepatan 5.000 rpm selama 300 detik. Selanjutnya, supernatan diambil lalu dilakukan penyaringan menggunakan Whatmann *nylon membran*, dan siap diinjeksikan ke dalam instrumen HPLC (Schreiber-Deturmeny *et al.*, 1996).

3.5.4 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Pada penelitian ini digunakan instrumen analisis sampel kromatografi yaitu *High Performance Liquid Chromatography* untuk mengetahui kadar teobromin dalam plasma dalam waktu tertentu. Prinsip dari HPLC ini adalah pemisahan analit-analit berdasarkan kepolarannya. Suatu sampel diinjeksikan ke dalam kolom maka sampel tersebut kemudian akan terurai dan terpisah menjadi suatu senyawa-senyawa kimia (analit) sesuai dengan perbedaan afinitasnya. Hasil pemisahan tersebut kemudian akan dideteksi oleh *detector* pada panjang gelombang tertentu yang akan dicatat oleh *recorder* yang dapat ditampilkan menggunakan integrator atau *personal computer* yang terhubung *online* dengan alat HPLC tersebut.

HPLC yang digunakan dalam penelitian ini adalah Shimadzu *analytical liquid chromatography* (LC) dengan C₁₈ sebagai kolomnya. *Mobile phase* yang digunakan dalam penelitian ini adalah metanol, asam asetat terkonsentrasi, dan *aquabidest* dengan perbandingan 20:1:79 (v/v/v) (de Sena *et al.*, 2011).

3.5.5 Bioavailabilitas Teobromin

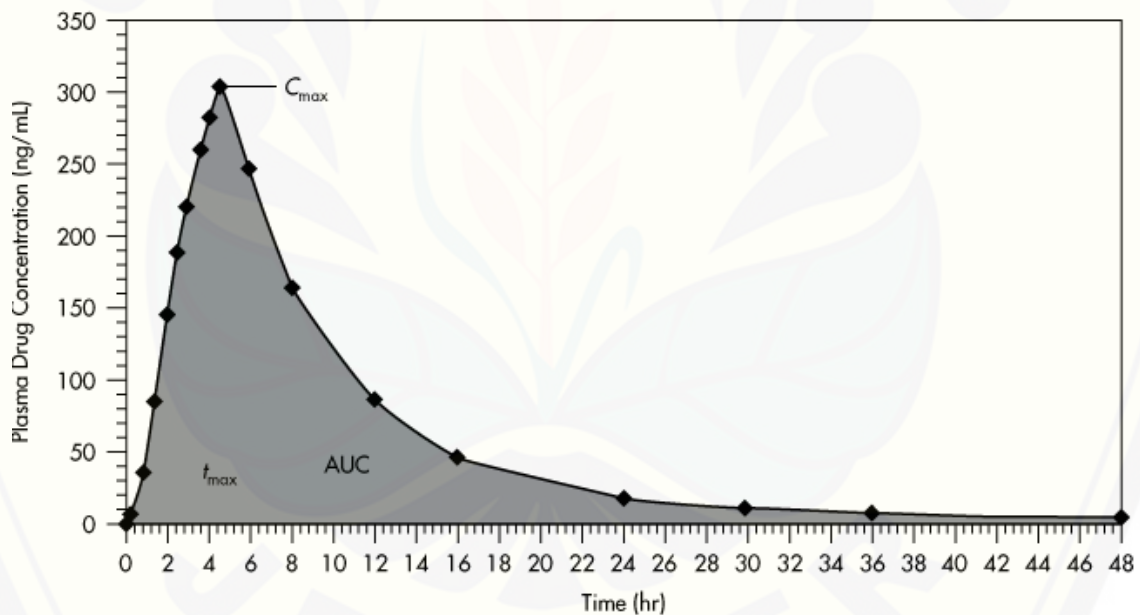
Bioavailabilitas (F) adalah salah satu parameter farmakokinetik yang menunjukkan kadar obat dalam bentuk aktif pada peredaran darah yang berhasil diabsorpsi oleh tubuh. Besarnya bioavailabilitas teobromin diukur dengan HPLC terhadap darah plasma sukarelawan pada jam ke 0, 1^{1/2}, 3, 6, 10, dan 24 setelah konsumsi *dark chocolate bar* secara oral. Hasilnya berupa kadar teobromin dalam darah pada jam tersebut. Setelah mendapatkan hasil, selanjutnya membuat kurva (lihat Gambar 3.1) dan melakukan perhitungan luas kurva atau yang disebut dengan *area under curve* selama 24 jam (AUC_{0→24}) dengan *linear trapezoidal method*. Selanjutnya dilakukan perhitungan AUC_{oral} atau AUC_{0→∞} dengan menggunakan rumus 3.1.

$$AUC_{\text{oral}} = AUC_{0 \rightarrow \infty} = AUC_{0 \rightarrow 24} + \frac{C_s(24)}{\beta} \quad (3.1)$$

AUC_{oral} adalah luas area di bawah kurva kadar obat per oral dalam plasma terhadap waktu, $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ adalah luas area di bawah kurva kadar obat dalam plasma terhadap waktu 0 hingga tak terhingga, $AUC_{0 \rightarrow 24}$ adalah luas area di bawah kurva kadar obat dalam plasma terhadap waktu 0 hingga jam ke-24, $C_s(24)$ adalah konsentrasi obat saat jam ke-24, sedangkan β diperoleh dari $0,693/t_{1/2}$. Sehingga bioavailabilitas dapat ditemukan dengan menggunakan rumus 3.2.

$$F = \frac{AUC_{oral}}{AUC_{iv}} \quad (3.2)$$

F adalah bioavailabilitas absolut obat oral dan AUC_{iv} adalah luas area di bawah kurva kadar obat via intravena dalam plasma terhadap waktu (Shively *et al.*, 1985; Shargel *et al.*, 2007).



Gambar 3.1 Grafik konsentrasi obat per satuan waktu (Shargel *et al.*, 2007). AUC: Area Under Curve; C_{max} : konsentrasi maksimal; t_{max} : waktu saat obat mencapai konsentrasi maksimal di dalam darah

3.5.6 Volume Distribusi Teobromin

Volume distribusi (V_d) adalah salah satu parameter farmakokinetik yang menunjukkan volume penyebaran obat dalam tubuh dengan kadar plasma atau serum. Volume distribusi merupakan volume semu, sehingga besarnya hanya dapat dihitung melalui suatu besaran yang disebut dengan *apparent volume of distribution* (aV_d) dengan rumus 3.3.

$$aV_d = \frac{F \cdot D_{\text{oral}}}{AUC_{\text{oral}} \cdot \beta} \quad (3.3)$$

aV_d adalah *apparent volume of distribution* dan D_{oral} adalah dosis obat yang diberikan secara oral.

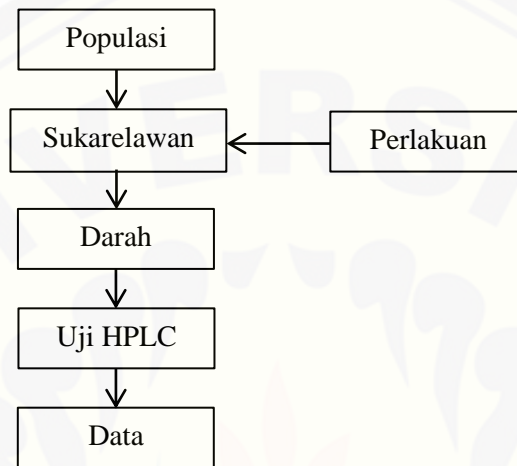
3.6 Bahan dan Alat Penelitian

Bahan untuk kelompok perlakuan terdiri dari cokelat batang *dark chocolate bar* dengan kandungan *cocoa liquor* sebesar 60% dengan berat 70 gram. Bahan yang digunakan untuk preparasi cokelat dan plasma sebelum injeksi ke dalam HPLC adalah *aquabidest*, asam perklorat 20%, asam asetat terkonsentrasi, dan metanol, serta standar teobromin.

Alat-alat yang digunakan untuk penelitian ini adalah spuit 3 ml, *vacuum tube* dengan heparin (*green tube*), *torniquet*, kapas alkohol, plester, *microtube*, mikropipet, vial, *ultracentrifuge*, *vortex*, lemari pendingin, membran nilon, serta segala komponen yang terdapat dalam *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), dan kalkulator untuk perhitungan rumus bioavailabilitas dan volume distribusi.

3.7 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Pre-Experimental Design* dengan *One-Shot Case Study*.



Gambar 3.2 Skema rancangan penelitian

3.8 Prosedur Pengambilan dan Analisis Data

3.8.1 Uji Kelayakan Etik

Pada penelitian ini, subjek yang digunakan adalah manusia yang dalam pelaksanaannya telah mendapatkan sertifikat kelayakan etik dari komisi etik kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Prosedur ini menjamin keamanan baik bagi peneliti maupun bagi sukarelawan, melindungi hak-hak sukarelawan serta memperjelas tujuan dan kewajiban peneliti.

3.8.2 Pengambilan Data

Pengambilan data pada penelitian ini dilakukan dengan cara sebagai berikut.

- Menyiapkan *dark chocolate bar*.
- Mengumpulkan 3 sukarelawan yang bersedia. Sebelumnya, sukarelawan bisa mengisi lembar *informed consent* terlebih dahulu.

- c. Melakukan pengambilan darah pada jam ke-0 dengan cara pungsi vena pada vena mediana cubiti.
- d. Sampel darah yang telah diambil disimpan dalam *vacuum tube* yang sudah diberi heparin (*heparin tube* atau *green tube*).
- e. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi menggunakan *ultra centrifuge* dengan kecepatan 3.000 rpm selama 300 detik pada sampel tersebut. Maka sampel darah tersebut akan terpisah menjadi plasma dan sel darah. Bagian plasma diambil dan disimpan dalam tabung spesimen yang akan diuji menggunakan HPLC. Memberi label pada tabung spesimen tersebut.
- f. Sukarelawan dapat mengonsumsi *dark chocolate* segera setelah disiapkan. *Dark chocolate bar* ini harus habis dalam sekali makan.
- g. Melakukan pencatatan waktu saat sukarelawan selesai konsumsi cokelat.
- h. Melakukan kembali langkah c, d, dan e pada jam ke 1^{1/2}, 3, 6, 10, dan 24 setelah konsumsi cokelat.
- i. Plasma yang telah terkumpul disimpan di dalam tabung spesimen pada suhu -20 °C hingga tiba saatnya dianalisis menggunakan HPLC.
- j. Melakukan preparasi plasma sebelum injeksi ke dalam HPLC seperti yang telah dijelaskan dalam definisi operasional.
- k. Setelah semua sampel plasma sukarelawan terkumpul dan telah dilakukan preparasi, langkah selanjutnya adalah mengirim sampel tersebut ke Laboratorium Kimia dan Instrumen Fakultas Farmasi Universitas Jember untuk dilakukan analisis sampel menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dan data diperoleh.

3.8.3 Analisis Data

Setelah memperoleh data kadar teobromin plasma tiap waktu yang sudah ditentukan (0, 1^{1/2}, 3, 6, 10, dan 24 jam setelah konsumsi), maka data-data yang diperoleh akan dihitung rata-rata tiap waktunya. Setelah itu, dilakukan pembuatan grafik konsentrasi obat dalam plasma per satuan waktu berdasarkan data tersebut

untuk memperoleh $AUC_{0 \rightarrow 24}$ yang dapat dihitung menggunakan *linear trapezoidal method*. Selanjutnya menghitung $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ atau AUC_{oral} menggunakan rumus 3.1, menghitung bioavailabilitas absolut oral menggunakan rumus 3.2, dan menghitung volume distribusi menggunakan rumus 3.3. Lalu dilakukan perhitungan keamanan coklat yang dikonsumsi.

