

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Nekrosis Tubular Akut pada Gagal Ginjal Akut

Ginjal adalah organ pelepasan terbesar dalam tubuh. Ginjal berperan dalam beberapa proses yaitu filtrasi, sekresi, reabsorpsi, juga fungsi endokrin dan fungsi metabolik. Dari peran-peran tersebut, diketahui bahwa fungsi utama ginjal adalah menghilangkan toksin serta mempertahankan homeostasis cairan dan elektrolit dalam tubuh. Adanya penurunan fungsi ginjal yang ditandai dengan penumpukan produk buangan seperti urea dan kreatinin menyebabkan terjadinya kondisi Gagal Ginjal Akut (GGA) (Dipiro *et al.*, 2008).

Ginjal merupakan organ yang rentan terhadap terjadinya iskemia dan adanya toksin yang menyebabkan vasokonstriksi, kerusakan endotel dan aktivasi proses inflamasi. Terdapat banyak hal yang menyebabkan GGA. Beberapa hal yang menjadi penyebab GGA yaitu terjadinya hipoperfusi ginjal tanpa adanya kerusakan di parenkim ginjal (prerenal), kerusakan langsung pada parenkim ginjal (intrinsik), dan adanya obstruksi di saluran kemih (paska-renal) (Sinto dan Ginova, 2010). GGA intrinsik dapat dikategorikan berdasarkan struktur tempat terjadinya kerusakan, diantaranya pada pembuluh darah ginjal, glomerulus, tubulus dan interstitium. Salah satu kondisi yang dapat menyebabkan GGA intrinsik adalah Nekrosis Tubular Akut (Dipiro *et al.*, 2008).

Nekrosis Tubular Akut (NTA) merupakan penyebab utama terjadinya GGA pada 38% pasien rawat inap dan 76% pasien ICU (Rinawati dan Aulia, 2011). NTA adalah suatu kondisi patologis yang menunjukkan adanya kerusakan pada sel epitel tubulus, sehingga dapat menyebabkan Gagal Ginjal Akut (GGA) yang ditandai dengan oligouria, proteinuria, dan peningkatan kadar kreatinin dan BUN serum. NTA dibedakan menjadi dua jenis berdasarkan penyebabnya, yaitu

nekrosis tubular akut toksik dan nekrosis tubular akut iskemia. Nekrosis tubular akut iskemia paling banyak disebabkan oleh trauma, syok dan sepsis. Sedangkan nekrosis tubular akut toksik disebabkan oleh beberapa zat yang dapat menyebabkan efek toksik pada ginjal, antara lain paparan etilen glikol, merkuri, timah, karbon tetraklorida dan obat-obatan nefrotoksik. Zat-zat toksik tersebut mempengaruhi metabolisme sel epitel sehingga menyebabkan NTA yang ditandai dengan nekrosis epitel tubulus proksimal. Kerusakan sel ini ditunjukkan dengan hilangnya nukleus, penampakan sitoplasma yang homogen dan lebih eosinofilik, namun membran basal tetap utuh sehingga epitel tubulus dapat beregenerasi (Romana, 2009).

Dalam perkembangannya, NTA diawali dengan adanya kerusakan sel berupa nekrosis atau apoptosis sel epitel tubulus, diikuti dengan hipoksia dan adanya respon inflamasi. Ketika sel tubulus mati, maka sel akan lepas dan menuju ke lumen tubulus. Hal tersebut menyebabkan debris yang meningkatkan tekanan tubular dan menurunkan filtrasi glomerulus. Selain itu, hal tersebut juga menyebabkan gangguan terhadap transfer cairan dan elektrolit menembus epitel tubulus dan memicu penurunan kemampuan untuk menghasilkan urin. Selanjutnya, hal-hal tersebut akan berkembang menjadi GGA (Dipiro *et al.*, 2008).

Terdapat 3 fase dalam perkembangan NTA, yaitu fase inisiasi (*initiation*), kerusakan menetap (*maintenance*), dan penyembuhan (*recovery*). Fase inisiasi terjadi ketika adanya paparan zat nefrotoksik maupun iskemia sehingga menyebabkan sel epitel tubulus rusak, penurunan laju filtrasi glomerulus dan penurunan jumlah urin. Kerusakan sel tubulus semakin parah pada fase kerusakan menetap, yang disertai dengan laju filtrasi glomerulus di bawah nilai normal dan jumlah urin yang semakin sedikit atau bahkan tidak ada. Namun pada beberapa kasus yang disebabkan oleh nefrotoksin dapat terjadi nonoliguria. Pada fase

penyembuhan, kondisi mulai membaik yang ditandai dengan poliuria dan laju filtrasi glomerulus perlahan menjadi normal (Rinawati dan Aulia, 2011).

## 2.2 Kerusakan Sel

### 2.2.1 Kerusakan Sel pada Nekrosis Tubular Akut

Kerusakan pada sel tubulus paling banyak terjadi pada bagian tubulus proksimal dan di lengkung Henle. Kerusakan sel yang terjadi dapat berupa nekrosis dan apoptosis. Perubahan yang terjadi pada tubulus proksimal diawali dengan terbentuknya gelembung di permukaan apikal dan hilangnya *brush border* pada membran, diikuti dengan hilangnya polaritas dan integritas *tight junction* sebagai barier sel epitel. Perubahan lain yang terjadi adalah pemindahan pompa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase dan inetrgrin ke membran apikal. Sel-sel tubulus yang rusak akan terlepas dan membentuk *cast*. Adanya hipoperfusi, *cast*, dan debris dari sel epitel tubulus yang rusak menyebabkan obstruksi di lumen tubulus. Hal-hal tersebut menyebabkan kebocoran filtrat pada epitel yang rusak sehingga menghasilkan proses filtrasi yang tidak efektif. Selain itu, iskemia menyebabkan penurunan produksi vasodilator (nitrit oksida, prostasiklin) oleh sel epitel tubulus sehingga memperparah vasokonstriksi dan hipoperfusi (Shah, 2016).

Pada tingkatan seluler, iskemia dan adanya toksin menyebabkan penurunan ATP, peningkatan kalsium sitosol, pembentukan radikal bebas, mengganggu metabolisme fosfolipid membran dan regulasi volume sel. Penurunan produksi ATP akan mengganggu beberapa fungsi sel, salah satunya adalah transpor aktif membran. Transpor membran yang tidak efektif akan menyebabkan regulasi volume dan elektrolit terganggu, yang memicu pembengkakan sel dan akumulasi natrium dan kalsium intraseluler. Terganggunya metabolisme fosfolipid menyebabkan lipid membran mengalami peroksidasi. Selain itu, peningkatan pembentukan radikal bebas akan menghasilkan efek toksik

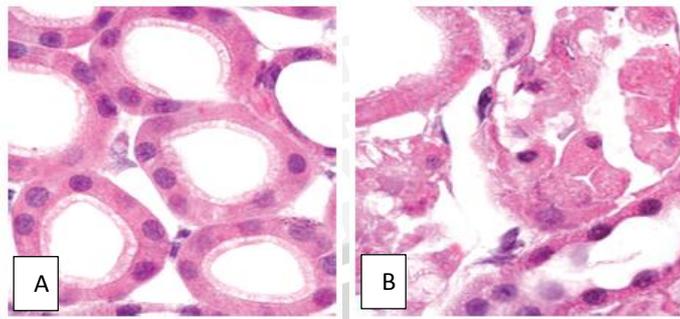
yang dapat menyebabkan terjadinya kerusakan pada sel epitel tubulus (Shah, 2016).

Radikal bebas adalah senyawa kimia dengan satu elektron tidak berpasangan di orbital terluar. Senyawa ini sangat tidak stabil dan dapat bereaksi dengan senyawa inorganik dan organik. Salah satu radikal bebas adalah *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) yang merupakan senyawa radikal bebas dari oksigen. Jumlah ROS yang berlebihan dapat menyebabkan kerusakan sel melalui mekanisme (Kumar, 2015):

- Ikatan ganda pada lipid *polyunsaturated* membran mudah terserang ROS. Interaksi antara lipid dan ROS akan menghasilkan peroksida yang memicu reaksi autokatalitik, sehingga terjadi peroksidasi lipid membran.
- Radikal bebas memicu *cross-linking* protein yang menyebabkan degradasi aktivitas enzim. Radikal bebas juga secara langsung menyebabkan fragmentasi polipeptida.
- Radikal bebas dapat bereaksi dengan timin di nukleus sehingga menyebabkan kerusakan DNA.

### 2.2.1 Morfologi Nekrosis

Nekrosis merupakan salah satu jenis kematian sel yang berhubungan dengan hilangnya integritas membran dan pecahnya isi sel. Hal tersebut memicu reaksi inflamasi lokal untuk menghilangkan sel-sel mati dan memulai proses perbaikan sel. Enzim yang berperan dalam fagositosis sel dapat berasal dari lisosom sel yang mati atau dari lisosom leukosit yang berperan dalam reaksi inflamasi. Morfologi nekrosis dapat dilihat pada gambar 2.2 (Kumar, 2015).



**Gambar 2.1** Gambaran Sel Normal dan Nekrosis (Kumar, 2015).

Keterangan: (A) Tubulus ginjal normal dengan sel epitel yang masih hidup (B) Sel epitel mengalami nekrosis, dengan hilangnya nukleus dan fragmentasi sel dan pecahnya isi sel

Nekrosis ditandai dengan terjadinya perubahan sitoplasma dan nukleus sel yang mengalami kerusakan. Sel yang mengalami nekrosis menunjukkan peningkatan eosinofil. Jika dibandingkan dengan sel yang masih hidup, sel nekrosis memiliki penampakan yang lebih homogen, *myelin figure* lebih menonjol, dan sitoplasma menjadi tervakuolisasi. Sedangkan perubahan nukleus pada sel nekrosis terbagi menjadi tiga jenis, yaitu *karyolysis*, *pyknosis*, dan *karyorrhexis*. *Karyolysis* ditandai dengan hilangnya basofilia kromatin. *Pyknosis* ditandai dengan penyusutan nukleus dan peningkatan basofilia, DNA memadat menjadi sebuah massa padat yang menyusut. Pada *karyorrhexis*, nukleus yang mengalami *pyknosis* mengalami fragmentasi dan pada 1-2 hari, nukleus menjadi tidak tampak (Kumar, 2015).

### 2.3 Gentamisin sebagai Agen Nefrotoksik

Salah satu toksin yang dapat menyebabkan NTA adalah obat-obatan nefrotoksik. Gentamisin adalah antibiotik golongan aminoglikosida yang biasa digunakan untuk terapi infeksi bakteri gram negatif. Namun obat ini juga memiliki efek nefrotoksik yang tinggi. Pada penelitian sebelumnya, hewan coba yang diinduksi dengan gentamisin mengalami perubahan secara histologi dan fungsi ginjal, yaitu pembentukan deskuamasi tubulus, nekrosis, peningkatan BUN dan

kreatinin serum. Kerusakan biasanya terjadi di korteks ginjal, seperti glomerulus dan tubulus proksimal. Pemberian antibiotik aminoglikosida dapat memicu pembentukan radikal bebas yang memicu terjadinya stress oksidatif. Di ginjal, radikal bebas diproduksi di sel mesangial glomerulus, sel endotel dan sel epitel tubulus. Adanya radikal bebas dapat merusak *glomerular basement membrane*, merusak fungsi tubulus, degradasi kolagen dan komponen matriks yang lain (Stojiljkovic *et al.*, 2014).

Kerusakan ginjal akibat gentamisin dikarenakan akumulasi obat di korteks ginjal. Aminoglikosida lebih banyak direabsorpsi di tubulus proksimal ginjal, sehingga menimbulkan kerusakan yang lebih tinggi pada nefron bagian tersebut. *Uptake* gentamisin ke dalam sel tubulus proksimal dimediasi oleh fosfolipid inositol polianionik atau megalin. Setelah memasuki sel tubulus proksimal dan endositosis, aminoglikosida akan terakumulasi di lisosom sehingga menyebabkan sel membesar dan menginduksi kerusakan sel (Leung *et al.*, 2004).

Gentamisin meningkatkan pembentukan Reactive Oxygen Species (ROS), seperti anion superoksida, radikal hidroksil, hydrogen peroksida, dan *reactive nitrogen species* di ginjal. ROS juga mengaktivasi *Nuclear Factor Kappa B* (NF- $\kappa$ B) yang menginduksi proses inflamasi. Produksi ROS yang berlebihan dapat menginduksi kerusakan sel dan nekrosis melalui beberapa mekanisme, yaitu peroksidasi lipid membran, denaturasi protein, dan kerusakan DNA. Gentamisin dapat menurunkan aktivitas enzim antioksidan ginjal yaitu katalase (CAT), Glutation Peroksidase (GPx), dan jumlah glutation. Gentamisin juga dapat berperan sebagai pengkelat besi, dan kompleks besi-gentamisin merupakan katalis yang poten dalam pembentukan radikal (Hanaa, 2016).

Menurut penelitian Leung (2004), pemberian gentamisin jangka pendek dapat meningkatkan ekspresi mRNA subunit utama ginjal dari reseptor NMDA yaitu NR1 dan NR2C. Di ginjal, gentamisin dapat berinteraksi dengan reseptor

NMDA sehingga memicu influx kalsium ke dalam sel melalui kanal kalsium NMDA yang menyebabkan terjadinya kerusakan sel ginjal. Peningkatan kalsium intrasel ini memicu aktivasi beberapa enzim yang berbahaya pada sel, yaitu fosfolipase yang berperan dalam kerusakan membran, protease yang dapat memecah protein membrane dan sitoskeletal, endonuklease yang berperan pada fragmentasi DNA dan kromatin, ATPase yang berperan dalam penurunan ATP. Peningkatan kalsium intrasel juga menginduksi apoptosis secara langsung melalui aktivasi caspase dan peningkatan permeabilitas mitokondria (Kumar, 2015).

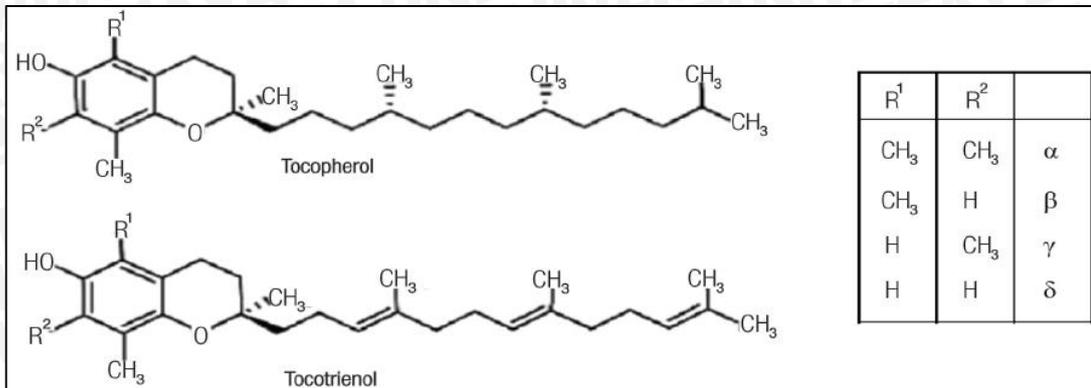
#### 2.4 Minyak Kelapa Sawit

Minyak kelapa sawit merupakan salah satu komoditas hasil perkebunan Indonesia. Saat ini Indonesia merupakan produsen dan eksportir minyak kelapa sawit terbesar di dunia. Indonesia bersama dengan Malaysia mendominasi total produksi minyak kelapa sawit dunia sekitar 85-90 persen (Anonim, 2016). Minyak kelapa sawit mentah (CPO) banyak digunakan sebagai bahan baku industri pembuatan minyak goreng, lilin, sabun, margarin, produk-produk perawatan tubuh dan juga pembuatan biodiesel (Kemendag, 2013).

Dari segi kesehatan, minyak kelapa sawit merupakan salah satu sumber vitamin E yang memiliki sifat antioksidan. Vitamin E merupakan antioksidan pemecah rantai yang poten dalam menghambat pembentukan molekul ROS ketika lipid mengalami oksidasi dan selama propagasi radikal bebas. Vitamin E bekerja sebagai pertahanan pertama terhadap peroksidasi lipid, melindungi membran sel dari serangan radikal bebas (Rizvi *et al.*, 2014).

Terdapat dua subfamili dari vitamin E yaitu tokotrienol dan tokoferol. Kedua subfamili tersebut masing-masing terdapat dalam 4 bentuk isomer yaitu  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , dan  $\delta$ . Tokoferol banyak terdapat pada daun dan biji tanaman dikotil, sedangkan

tokotrienol merupakan bentuk vitamin E yang banyak terdapat di biji tanaman monokotil, dan sedikit di tanaman dikotil (Sen *et al.*, 2011).



**Gambar 2.2 Struktur Kimia Tokoferol dan Tokotrienol (Rizvi *et al.*, 2014).**

Berdasarkan penelitian, pemberian tokoferol dengan beberapa bentuk isomer memiliki efek penghambatan peroksidasi lipid yang lebih besar dibandingkan dengan pemberian  $\alpha$ -tokoferol tunggal. Alfa-tokoferol lebih utama menghambat pembentukan radikal bebas baru, sedangkan gamma-tokoferol bekerja dengan menjebak dan menetralisasi radikal bebas yang sudah ada. Selain memiliki aktivitas *peroxyl radical scavenging*, tokoferol juga melindungi asam lemak *polyunsaturated* yang ada di fosfolipid membran dan lipoprotein plasma (Rizvi *et al.*, 2014).

Selain mengandung tokoferol, minyak kelapa sawit juga mengandung tokotrienol. Minyak kelapa sawit merupakan sumber alami  $\alpha$ -tokotrienol terbesar. Kandungan vitamin E dalam minyak kelapa sawit (CPO) adalah 70% tokotrienol dan 30% tokoferol (Sen *et al.*, 2011). Berdasarkan penelitian Khan *et al.* (2010), pemberian tokotrienol dapat menurunkan kerusakan tubulus proksimal dan peroksidasi lipid ginjal. Tokotrienol dapat meningkatkan kadar glutathion (GSH) dan aktivitas katalase di korteks ginjal yang berperan dalam proses inaktivasi radikal bebas. Tokotrienol memberikan aktivitas antioksidan yang lebih efektif dibandingkan  $\alpha$ -tokoferol. Berdasarkan hasil penelitian,  $\alpha$ -tokotrienol menunjukkan

aktivitas antioksidan terhadap oksidasi lipid yang lebih tinggi dibandingkan dengan  $\alpha$ -tokoferol dan aktivitas *peroxyl radical scavenging* yang lebih tinggi di liposom.  $\alpha$ -tokotrienol lebih efektif melindungi kematian sel akibat induksi glutamat dibandingkan  $\gamma$ -tokotrienol dan  $\alpha$ -tokoferol (Musa *et al.*, 2010).

Tokotrienol juga dapat menghambat aktivitas *3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A* (HMG-CoA) reduktase yang berperan dalam sintesis kolesterol. HMG-CoA reduktase merupakan target enzim yang sama dengan obat golongan statin untuk kondisi dislipidemia. Selain itu, tokotrienol dalam minyak kelapa sawit juga dapat menghambat pertumbuhan sel kanker payudara manusia (Sen *et al.*, 2011).

Berdasarkan penelitian Tan *et al.* (2011), pemberian *Oil Palm Leaves* (OPL) dengan rentang dosis 50-200 mg/kgBB pada tikus menunjukkan adanya efek protektif pada organ ginjal dan hati dalam keadaan hiperglikemia. Kelompok dosis 100 mg/kgBB menunjukkan kerusakan ginjal yang lebih rendah dibandingkan kelompok dosis yang lain. Selain itu, pemberian OPL juga menunjukkan adanya perbaikan fungsi ginjal dan hati dibandingkan kelompok kontrol.

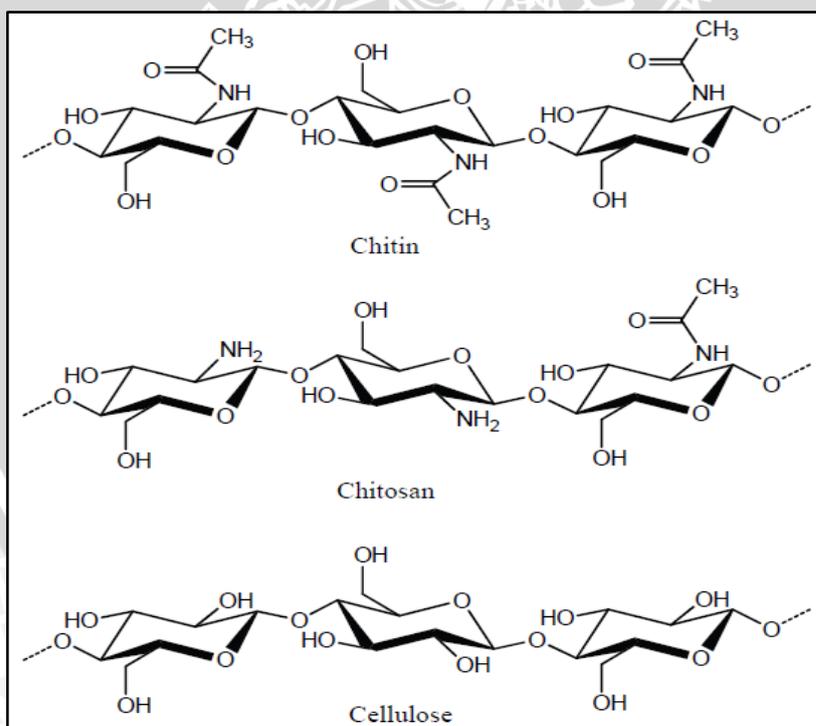
Pemberian minyak kelapa sawit dengan dosis 100-1000 mg/kgBB pada tikus dengan kondisi hamil normal menunjukkan tidak adanya toksisitas. Efek pemberian minyak kelapa sawit diteliti pada perkembangan embrio selama masa kehamilan dan perkembangan bayi tikus yang dilahirkan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan antara kelompok dosis terapi dan kelompok kontrol (Hammid *et al.*, 2014).

## 2.5 Kitosan sebagai Pembawa Obat

Kitosan merupakan polimer alami yang terdiri dari glukosamin dan N-asetil glukosamin. Kitosan didapatkan dari proses deasetilasi kitin yang berasal dari cangkang *crustacea*. Sifat-sifat kitosan seperti, non-toksik, *biodegradable*,

biokompatibel, dan antibakteri membuat kitosan banyak diteiliti sebagai pembawa obat. Sifat-sifat fisika dan kimia kitosan, seperti ikatan hidoregn intermolekuler dan intramolekuler, muatan kationik pada media asam membuat para peneliti semakin tertarik untuk mengembangkannya dalam produk farmasi (Mitra, 2011).

Kitosan dan kitin dibedakan berdasarkan derajat deasetilasi (DD) yang ditentukan dari proporsi jumlah D-glukosamin dan N-asetil D-glukosamin. Struktur kimia kitosan berbentuk kopolimer rantai lurus, terdiri dari D-glukosamin dan N-asetil D-glukosamin yang didapatkan dari proses deasetilasi parsial kitin. Polimer ini memiliki kemiripan struktur dengan selulosa, yaitu hanya memiliki satu monomer glukosa. Kitosan dapat larut setelah pengadukan dalam larutan asam, seperti asetat, nitrat, hidroklorat, perklorat dan fosfor (Alvarenga, 2011). Struktur kitin, kitosan dan selulosa ditunjukkan pada gambar 2.1.



Gambar 2.3 Struktur kitin, kitosan, dan selulosa

Kitosan banyak dikembangkan dalam bidang farmasetik, salah satunya sebagai pembawa obat ke ginjal. Kitosan berat molekul rendah/*Low Molecular Weight Chitosan* (LMWC) dengan berat molekul 19 hingga 31 kDa dapat menjadi pembawa obat yang baik ke ginjal. LMWC dapat secara spesifik di-uptake oleh sel tubulus ginjal melalui jalur megalin. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa prednisone yang dikonjugasikan dengan LMWC dapat terdistribusi 13 kali lebih banyak di ginjal dibandingkan prednisone tanpa pembawa, sehingga toksisitas prednisone dapat berkurang (Zhou *et al.*, 2013).

Penelitian lain yang dilakukan oleh Gao *et al.* (2014), membandingkan penghantaran nanopartikel kitosan/SiRNA dengan berat molekul kitosan yang berbeda (40, 190, 250, 270 kDa). Dari penelitian tersebut, diketahui bahwa hanya nanopartikel dengan berat molekul kitosan 40 kDa yang terakumulasi secara signifikan di korteks ginjal. Hal tersebut menunjukkan bahwa kitosan dengan berat molekul 40 kDa efisien untuk dimanfaatkan sebagai penghantaran obat ke ginjal. Berdasarkan penelitian lain yang dilakukan oleh Yuan *et al.* (2011), kitosan dengan berat molekul <70 kDa memiliki sifat tertarget yang efisien karena dapat lebih mudah berpindah dari sirkulasi ke lumen tubulus melalui filtrasi glomerulus.