

repository.ub.ac.id

## Efek Mikrosfer Kitosan Minyak Kelapa Sawit terhadap Kadar Colony Stimulating Factor 1 pada Nekrosis Tubular Akut secara *In Vivo*

### Effect of CPO in Chitosan Microspheres for Colony Stimulating Factor 1 Levels in Acute Tubular Necrosis (In Vivo Study)

Ahadiya Rosalina

Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

Telp. (0341) 569117, E-mail: ahadia.rosalina@gmail.com

#### ABSTRAK

NTA (Nekrosis Tubular Akut) merupakan gangguan pada sel tubulus ginjal yang terjadi baik akibat iskemi maupun paparan nefrotoksin yang menyebabkan kerusakan sel tubulus ginjal sehingga mengakibatkan gagal ginjal akut. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa kadar CSF-1 yang tinggi menghasilkan perbaikan sel yang lebih baik di ginjal yang mengalami iskemi. Salah satu agen yang berasal dari bahan alam dan dapat digunakan sebagai terapi NTA adalah minyak kelapa sawit (CPO) yang mengandung senyawa tokols. CPO dalam mikrosfer kitosan BMR mampu menyebabkan akumulasi CPO di ginjal untuk mengoptimalkan efek terapi sehingga dapat meningkatkan kadar CSF-1 dan memicu perbaikan NTA. Studi *posttest experimental* dengan *controlled group design* dilakukan pada 24 *Mus musculus*. Sampel dibagi menjadi 6 kelompok, yaitu kontrol positif (KP), kontrol negatif (KN), kelompok NTA+CPO dosis 0,071 mg/gBB dalam mikrosfer kitosan (P1), kelompok NTA+CPO dosis 0,107 mg/gBB dalam mikrosfer kitosan (P2), kelompok NTA+CPO dosis 0,140 mg/gBB (P3), dan kelompok NTA+CPO dosis 0,210 mg/gBB (P4). Variabel yang diukur adalah kadar CSF-1 menggunakan metode spektrofotometri dengan prinsip enzimatis Elisa. Hasil yang diperoleh menunjukkan nilai CSF-1 dari tinggi ke rendah secara berturut-turut adalah P3 ( $0,300 \pm 0,103$  ng/L); KN dengan nilai tengah 0,255 ng/L; P1 ( $0,220 \pm 0,076$  ng/L); P2 ( $0,180 \pm 0,104$  ng/L); P4 ( $0,120 \pm 0,090$  ng/L); dan KP ( $0,080 \pm 0,033$  ng/L) dimana terdapat perbedaan yang bermakna antara KP dengan KN, P1, dan P3 dengan nilai signifikansi ( $p < 0,05$ ). Sehingga dapat disimpulkan bahwa CPO dengan dosis 0,071 mg/gBB dalam mikrosfer kitosan mampu meningkatkan kadar CSF-1 ginjal secara signifikan pada kondisi NTA.

**Kata Kunci:** GGA, NTA, Mikrosfer, Minyak Kelapa Sawit, CSF-1

#### ABSTRACT

ATN (Acute Tubular Necrosis) is a disturbance of renal tubular cells that is caused by ischemic or nephrotoxin exposure. This condition leads renal tubular cells injuries and acute renal failure (ARF). Previous studies showed that high CSF-1 levels lead better cells improvement in ischemic renal condition. One of natural agent that can be used as ATN therapy is palm oil (CPO) which contains tocopherols. CPO with low molecular weight of chitosan microspheres provides accumulation of CPO in kidney which optimizes therapeutic effect and increases CSF-1 levels to lead ATN repair. Posttest only experimental and controlled group design was applied to 24 of *Mus musculus*. Subjects were divided into 6 groups, consist of positive control (KP), negative control (KN), group of ATN + 0,071 mg/gBB CPO in chitosan microspheres (P1), group of ATN + 0,107 mg/gBB CPO in chitosan microspheres (P2), group of ATN + 0,140 mg/gBB CPO (P3), and group of ATN + 0,210 mg/gBB CPO (P4). CSF-1 levels were measured using spectrophotometry methods and enzymatic reaction (Elisa). The result of this study showed highest to lowest CSF-1 levels are P3 ( $0,300 \pm 0,103$  ng/L); KN (median CSF-1 level is 0,255 ng/L); P1 ( $0,220 \pm 0,076$  ng/L); P2 ( $0,180 \pm 0,104$  ng/L); P4 ( $0,120 \pm 0,090$  ng/L); and KP ( $0,080 \pm 0,033$  ng/L). There were significant differences among KP with KN, P1, and P3 and with significant value ( $p < 0,05$ ). From this result, we can conclude that 0,071 mg/gBB CPO in chitosan microspheres provides increasing CSF-1 levels significantly in ATN condition.

**Keyword:** ARF, ATN, Microsphere, Palm Oil, CSF-1

## PENDAHULUAN

NTA (Nekrosis Tubular Akut) merupakan gangguan pada sel-sel yang ada di ginjal, khususnya sel tubulus yang terjadi baik akibat iskemi maupun paparan nefrotoksin sehingga terjadi kematian dan kerusakan sel tubulus ginjal.<sup>1</sup> Hal ini menyebabkan disfungsi tubulus sehingga terjadi GGA (Gagal Ginjal Akut).<sup>2</sup> NTA juga sering disebut sebagai penyebab GGA intrinsik yang paling umum terjadi pada pasien rawat inap.<sup>3</sup> Persentase mortalitas pasien rawat inap yang mengalami NTA adalah sebesar 37,1% dan pasien ICU sebesar 78,6%.<sup>1</sup> NTA merupakan penyebab utama GGA di rumah sakit, yaitu sebanyak 38% untuk pasien rawat inap dan sebesar 76% pada pasien ICU.<sup>2</sup>

GGA merupakan keadaan klinis berupa penurunan fungsi ginjal secara mendadak sehingga terjadi peningkatan hasil metabolik (seperti ureum dan kreatinin) di dalam darah.<sup>4</sup> Penurunan fungsi ginjal yang terjadi biasanya dimulai dari hitungan jam hingga hitungan minggu.<sup>5</sup> Beberapa laporan di dunia menunjukkan angka kematian akibat GGA mencapai 25-80% dengan insiden dalam komunitas sebesar 0,5-0,9% dan 0,7-18% pada pasien rawat inap di rumah sakit.<sup>6</sup> GGA tidak secara langsung menyebabkan kematian namun kematian biasanya disebabkan karena infeksi dan komplikasi yang dialami akibat kondisi GGA.<sup>7</sup>

Terapi GGA sangat ditentukan oleh penyebab dan tingkat keparahan GGA. Upaya yang dapat dilakukan adalah penatalaksanaan penyebab secara optimal seperti rehidrasi, terapi sepsis, penghentian zat nefrotoksik, dan sebagainya namun tindakan ini hanya sebatas terapi untuk mencegah progresivitas dan menangani gejala. Dalam penatalaksanaan GGA, terdapat beberapa jenis obat yang sudah digunakan secara empiris namun penggunaannya masih menjadi kontroversi. Obat-obat tersebut diantaranya adalah diuretik, manitol, dan dopamin.<sup>6</sup> Berdasarkan hasil studi meta analisis, terapi menggunakan dopamin, diuretik, maupun manitol tidak menunjukkan adanya penurunan mortalitas maupun perbaikan kondisi GGA.<sup>8</sup> Tata laksana lain yang dapat dilakukan pada kondisi GGA adalah pemberian terapi penggantian ginjal (renal replacement therapy) seperti menggunakan hemodialisis dan dialisis peritoneal. Namun selain mahal, terapi ini juga dapat menimbulkan berbagai komplikasi yang merugikan pasien seperti aritmia, pendarahan intrakranial, hemolisis, emboli paru, dan sebagainya.<sup>9</sup>

Saat ini, sedang dikembangkan terapi herbal untuk kondisi gangguan ginjal. Salah satu agen yang memiliki peran terhadap perbaikan kondisi gangguan

ginjal adalah minyak kelapa sawit (CPO). Alfa tokotrienol yang terkandung dalam CPO mampu mencegah kematian sel yang diinduksi oleh glutamat.<sup>10</sup> Reseptor glutamat atau NMDA (N-metil-D-aspartat) salah satunya terdapat di ginjal dimana aktivasi dari reseptor tersebut dapat menginduksi stres oksidatif dan berperan pada beberapa penyakit di ginjal.<sup>11</sup> Kematian sel yang diinduksi oleh reseptor NMDA dapat diturunkan oleh ekspresi CSF-1 (Colony Stimulating Factor 1).<sup>12</sup> Hasil penelitian sebelumnya juga menunjukkan ekspresi CSF-1 yang mampu memperbaiki sel ginjal pada hewan coba yang mengalami iskemi ginjal.<sup>13</sup>

Untuk mengoptimalkan efek terapi dari CPO pada ginjal, maka diperlukan sistem penghantaran menuju ginjal. Salah satu strategi yang dapat digunakan dalam hal ini adalah pemanfaatan kitosan berat molekul rendah. Kitosan berat molekul rendah (BMR) memiliki kemampuan yang mudah dieliminasi di ginjal dan dapat ditangkap oleh sel tubulus ginjal melalui megalin sehingga dapat membantu sistem penghantaran obat menuju ginjal.<sup>14</sup> Selain sebagai agen untuk menghantarkan obat ke ginjal, kitosan BMR juga memiliki kemampuan renoprotektif.<sup>15</sup>

Salah satu sistem penghantaran obat yang dapat digunakan untuk penghantaran ke organ ginjal adalah sistem mikrosfer. Mikrosfer dapat diberikan baik secara oral maupun parenteral dengan sistem penghantaran tertuju pada organ tertentu. Melalui penggunaan mikrosfer, pelepasan obat dapat terjadi dengan mudah.<sup>16</sup> Life span dari obat dapat ditingkatkan dan pelepasan zat aktif dapat terkontrol dengan menggunakan mikrosfer. Ukuran yang kecil dari mikrosfer menyebabkan rasio luas permukaan dengan volume menjadi besar sehingga dapat meningkatkan bioavailabilitas obat. Selain itu, mikrosfer juga dapat digunakan untuk mengontrol pelepasan obat yang tidak larut (non polar). Mikrosfer dengan menggunakan kitosan telah digunakan untuk mengontrol pelepasan banyak obat dan digunakan untuk mempengaruhi bioavailabilitas obat.<sup>17</sup>

Berdasarkan penjelasan di atas, dapat terlihat bahwa NTA memiliki angka mortalitas yang cukup tinggi dan merupakan penyebab yang umum dari GGA sehingga penggunaan CPO melalui sistem penghantaran ke ginjal dengan menggunakan mikrosfer kitosan BMR diharapkan dapat meningkatkan kadar CSF-1 di jaringan ginjal yang berperan dalam perbaikan sel di ginjal pada hewan coba model NTA untuk mencegah GGA. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek pemberian CPO dalam mikrosfer

kitosan BMR terhadap kadar CSF-1 ginjal pada kondisi NTA.

## METODE

### Uji Separasi Komponen CPO

CPO yang diperoleh dari PT SMART Surabaya dilakukan uji separasi komponen senyawa menggunakan metode KLT (Kolom Lapis Tipis). Fase diam yang digunakan adalah plat silica dengan fase gerak atau eluen berupa campuran n-heksan dan isopropanol dengan perbandingan 98:2 sebanyak 20 mL. CPO diencerkan menggunakan n-heksan untuk mempermudah pengaplikasian sampel. Sampel yang diaplikasikan pada plat sebanyak  $\pm$  2 mL. Noda yang tampak kemudian diamati secara visual atau menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan  $\lambda=254$  nm.<sup>18</sup> Kemudian dihitung jarak noda sehingga diperoleh nilai Rf melalui persamaan:<sup>19</sup>

$$R_f = \frac{\text{Jarak noda dengan batas bawah}}{\text{Jarak batas atas dan batas bawah}}$$

### Pembuatan Kitosan BMR

Kitosan yang diperoleh dari Phyedumedia kemudian direaksikan dengan HCl 1 M selama 2 jam pada suhu 70°C menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 700 rpm. Setelah 2 jam, ditambahkan NaOH 1 N hingga diperoleh pH 6,5-7. Kemudian dilakukan penyaringan dan endapan yang diperoleh dikeringkan menggunakan oven 40°C (selama 48 jam) hingga diperoleh kitosan BMR yang kering.<sup>20,21</sup>

### Pengukuran Berat Molekul Kitosan BMR

Kitosan BMR kemudian dilarutkan dalam asam asetat 1% sebanyak 100 mL hingga diperoleh konsentrasi berturut-turut 0,00%; 0,02%; 0,04%; 0,06%; dan 0,08%. Selanjutnya, masing-masing konsentrasi dimasukkan ke viskometer untuk dihitung nilai viskositas spesifik menggunakan persamaan *Mark-Houwink*, yaitu:<sup>20</sup>

$$\eta_{sp} = \frac{t-t_0}{t_0}$$

Keterangan:

$\eta_{sp}$  = Viskositas spesifik

t = Waktu yang diperlukan untuk mengalirnya larutan sampel (detik)

t<sub>0</sub> = Waktu yang diperlukan untuk mengalirnya larutan solven (detik)

Untuk memperoleh data berat molekul maka dibuat persamaan garis antara  $\eta_{sp}$ /konsentrasi terhadap konsentrasi. Setelah itu dihitung viskositas intrinsik dengan mencari titik pada grafik yang

menunjukkan nilai konsentrasi = 0. Kemudian dihitung berat molekulnya melalui persamaan Mark Houwink, yaitu:<sup>20</sup>

$$[\eta] = kM^\alpha$$

Keterangan:<sup>22</sup>

[ $\eta$ ] = Viskositas intrinsik

M = Berat Molekul (g/mol)

k = Konstanta pelarut (0,56 x 10<sup>-4</sup>)

$\alpha$  = Konstanta (1,02)

### Pembuatan Mikrosfer Kitosan CPO

Pembuatan mikrosfer kitosan CPO diawali dengan menyiapkan kitosan sebanyak 1.5 gram yang kemudian dilarutkan dalam 50 ml asam laktat 2.4%. Campuran kitosan dan asam laktat kemudian diaduk menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 700 rpm selama 1 jam hingga terbentuk larutan. Kemudian CPO sebanyak 10 mL ditambahkan kedalam larutan kitosan dan diaduk selama 15 menit menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 700 rpm. Setelah itu disiapkan 120 ml larutan STPP 5% b/v dan ditambahkan campuran kitosan-CPO menggunakan spuit 18 G *needle* sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 700 rpm selama 15 menit. Kemudian ditambahkan formaldehida 1.3% sampai terbentuk partikel ( $\pm$ 3mL), kemudian diaduk lagi menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 700 rpm selama 15 menit. Setelah itu dilakukan penyaringan dengan kertas saring *whatman* No 1 dan dibilas dengan 10 ml aseton. Kemudian mikrosfer ditambahkan dengan 20 mL aseton dan dicampur selama beberapa menit. Hasil pencampuran kemudian dikeringkan dalam petridisk selama 18 jam di suhu ruangan.<sup>23</sup>

### Evaluasi Bentuk dan Diameter Mikrosfer

Bentuk dari mikrosfer dievaluasi melalui alat Scanning Electroscopy Microscope (SEM) melalui ditambakkannya sejumlah mikrosfer ke dalam wadah sampel yang terdapat pada perangkat SEM dan kemudian wadah sampel ditempatkan di alat. Tegangan percepatan yang digunakan adalah sebesar 20 kV dengan tekanan 88 Pa dan dengan perbesaran 5.000 kali.<sup>24</sup>

### Uji Efektivitas Mikrosfer Kitosan CPO

Uji efektivitas mikrosfer CPO dilakukan pada 24 hewan coba mencit *Mus musculus* BALB-C jenis kelain jantan umur 2-3 bulan dengan bobot 20-30 gram. Mencit dibagi ke dalam 6 kelompok yaitu kontrol negatif (KN), kontrol positif (KP), kelompok NTA + 0,14 mg/gBB

mikrosfer kitosan CPO (P1), kelompok NTA + 0,21 mg/gBB mikrosfer kitosan CPO (P2), kelompok NTA + 0,14 mg/gBB CPO (P3), dan kelompok NTA + 0,21 mg/gBB CPO (P4).

KP, P1, P2, P3, dan P4 diinduksi menggunakan gentamisin 0,14 mg/gBB selama 7 hari secara intraperitoneal. Tiga hari kemudian, P1, P2, P3, dan P4 mulai diberikan perlakuan dengan pemberian CPO atau mikrosfer kitosan CPO secara oral selama 14 hari. Untuk memudahkan proses pemberian, CPO dan mikrosfer kitosan CPO didispersikan dalam larutan CMC-Na 1%.

### Pengukuran CSF-1

Setelah 14 hari perlakuan, diambil ginjal mencit yang kemudian dibentuk *lysate* jaringan dan diukur kadar CSF-1 nya menggunakan spektrofotometer dengan prinsip enzimatik Elisa.

## HASIL PENELITIAN

### Hasil Uji Separasi Komponen CPO

Hasil uji separasi komponen CPO menggunakan metode KLT adalah berupa jarak noda dan nilai Rf yang dapat dilihat pada **Tabel 1**. Rata-rata nilai Rf yang diperoleh adalah sebesar  $0,3125 \pm 0,0141$ . Nilai Rf yang dihasilkan mendekati dengan nilai Rf kelompok senyawa tokols dalam CPO yaitu 0,34.<sup>18</sup> Berdasarkan data tersebut maka dapat disimpulkan bahwa CPO yang digunakan dalam penelitian mengandung kelompok senyawa tokols yang umumnya terkandung dalam CPO.

**Tabel 8.1 Hasil Uji KLT**

	Jarak Noda (cm)	Nilai Rf
Uji ke-1	2,6	0,325
Uji ke-2	2,5	0,3125
Uji ke-3	2,4	0,3

### Hasil Pembuatan dan Pengukuran Berat Molekul Kitosan BMR

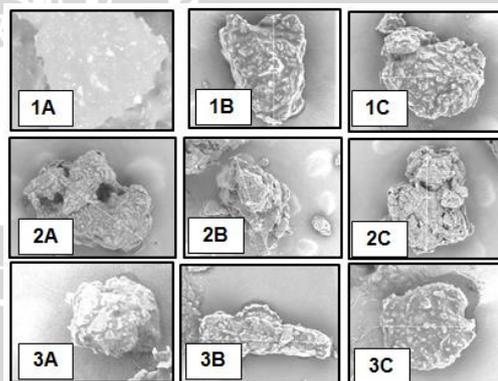
Kitosan BMR yang diperoleh dari proses pembuatan menggunakan reaksi deasetilasi dengan HCl 1 M adalah sebanyak  $3,1550 \pm 0,0980$  gram atau sebanyak 39,4375% dari 8 gram kitosan biasa. Rata-rata berat molekul yang diperoleh adalah sebesar  $34,837 \pm 3,849$  kDa. Kitosan dengan berat molekul <70 kDa lebih mudah menuju ke ginjal melalui sistem filtrasi glomerulus.<sup>25</sup> Berdasarkan data tersebut maka kitosan BMR yang dihasilkan memiliki berat molekul yang

sesuai untuk membantu sistem penghantaran menuju ginjal.

### Hasil Pembuatan dan Evaluasi Mikrosfer

Mikrosfer yang diperoleh dari proses pembuatan dengan metode *crosslinking* ini adalah sebanyak  $4,1860 \pm 0,1432$  gram dari 10 mL atau setara dengan 9,13 gram CPO yang digunakan. Melalui perhitungan, maka dapat diketahui kadar CPO dalam tiap milligram mikrosfer yaitu sebanyak 0,05095 mg.

Mikrosfer kemudian dilakukan evaluasi dengan SEM dan diperoleh besar diameter rata-rata batch 2 yaitu  $562,3 \pm 109 \mu\text{m}$ ; batch 3 yaitu  $196,0 \pm 35 \mu\text{m}$ ; dan batch 1 hanya diperoleh dua data diameter yaitu sebesar 263 dan 289  $\mu\text{m}$ . Mikrosfer batch 2 dan 3 kemudian dilakukan uji statistik parametrik dengan *Independent t-test* untuk mengetahui perbedaan diameter antara kedua batch. Hasil uji menunjukkan perbedaan diameter yang signifikan dengan nilai signifikansi ( $p < 0,05$ ). Ukuran mikrosfer yang optimal sebagai sistem penghantaran ke ginjal adalah sebesar 180-700  $\mu\text{m}$ .<sup>26,27</sup> Bentuk yang dimiliki mikrosfer dapat dilihat pada **Gambar 1** dimana terlihat bahwa sebagian besar mikrosfer memiliki bentuk yang mendekati *spheric* hingga *spheric*. Apabila dilihat dari segi ukuran dan bentuk, maka dapat disimpulkan bahwa mikrosfer kitosan CPO yang dihasilkan telah sesuai untuk membantu sistem penghantaran menuju ginjal.



**Gambar 1. Hasil Evaluasi Bentuk Mikrosfer**

**Keterangan:** (1A) (200x), (1B) (400x), dan (1C) (400x) merupakan mikrosfer hasil batch 1; (2A) (200x), (2B) (150x), dan (2C) (250x) merupakan mikrosfer hasil batch 2; dan (3A) (600x), (3B) (500x), dan (3C) (400x) merupakan mikrosfer hasil batch 3.

### Hasil Uji Efektivitas Mikrosfer Kitosan CPO

Setelah dilakukan pembuatan mikrosfer CPO, dapat ditentukan dosis CPO yang terkandung mikrosfer sehingga dosis pemberian mikrosfer kitosan CPO sebesar 0,14 dan 0,21 mg/gBB berturut-turut setara dengan 0,071 dan 0,107 mg/gBB CPO dalam mikrosfer

kitosan. Perlakuan pemberian CPO dan mikrosfer kitosan CPO dilakukan sekali sehari selama 14 hari secara oral.

### Hasil Pengukuran CSF-1 di Ginjal

Hasil pengukuran kadar CSF-1 di ginjal dapat dilihat pada **Tabel 2**. Untuk KN memiliki kadar CSF-1 dengan nilai minimal sebesar 0,099 ng/L dengan nilai maksimum sebesar 0,270 ng/L dan nilai median sebesar 0,255 ng/L.

**Tabel 2. Kadar Rata-Rata Hasil Pengukuran CSF-1 di Ginjal**

Kelompok	Kadar CSF-1 tiap 1 mg Ginjal Mencit (ng/L)
KP	0,080 ± 0,033
P1	0,220 ± 0,076
P2	0,180 ± 0,104
P3	0,300 ± 0,103
P4	0,120 ± 0,090

Kadar CSF-1 KN, KP, P1, dan P2 kemudian dilakukan uji statistik menunjukkan terdapat perbedaan kadar CSF-1 yang signifikan antar kelompok secara keseluruhan dan terdapat perbedaan kadar CSF-1 yang signifikan antara KN terhadap KP, KP terhadap P1 dan P3, serta P4 terhadap P1 dan P3. Hasil uji statistik pada KN, KP, P3, dan P4 juga menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok. Dilakukan pula analisis statistik pada KP, P1, P2, P3, dan P4 dengan hasil yang menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antara KP dengan P1 dan P3 serta P4 dengan P1 dan P3. Namun, tidak dapat dilakukan penarikan kesimpulan dari hasil perbandingan kelompok perlakuan CPO dengan mikrosfer kitosan CPO karena dosis CPO yang diberikan tanpa pembawa tidak setara dengan CPO dalam bentuk mikrosfer kitosan.

### DISKUSI

CPO mengandung senyawa tokols dimana Alfa dan gama tokotrienol menunjukkan efek perlindungan terhadap kerusakan dan kematian sel yang diinduksi oleh reseptor NMDA.<sup>10</sup> Kematian sel yang disebabkan karena eksitotoksik dari ekspresi reseptor NMDA dapat diturunkan secara signifikan oleh CSF-1.<sup>12</sup> Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa pemberian tokols pada hewan coba setelah mengalami iradiasi akan memicu efek proteksi terhadap kerusakan sel akibat stres oksidatif dan mempercepat terjadinya perbaikan sel dengan meningkatkan kadar beberapa sitokin, diantaranya adalah G-CSF.<sup>28</sup> Maka keberadaan

senyawa tokols dalam CPO diharapkan dapat memicu perbaikan sel melalui peningkatan kadar CSF-1.

Target kerja CPO dalam penelitian ini adalah di ginjal, dimana telah diketahui bahwa senyawa yang dapat masuk ke ginjal hanyalah senyawa yang bersifat polar atau berbentuk ion dengan berat molekul < 5-10 kDa atau berbentuk protein dengan berat molekul < 60 kDa.<sup>5</sup> Karena senyawa tokols bersifat nonpolar, maka tokols akan mengalami metabolisme di liver membentuk senyawa turunan karboksietil-hidroksikroman atau yang biasa disebut CEHC dimana senyawa ini bersifat polar sehingga dapat masuk ke ginjal.<sup>29,30</sup> Pada CEHC masih terdapat gugus OH yang memiliki efek antioksidan sehingga efek antioksidan dari tokols masih tetap berlangsung setelah mengalami metabolisme. Melalui pemberian antioksidan maka kerusakan sel akibat stres oksidatif dan proses kerusakan sel lebih lanjut dapat dihambat. Akibatnya, proses perbaikan sel lebih cepat terjadi melalui peningkatan kadar CSF-1. Namun, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait mekanisme perbaikan sel yang diinduksi oleh senyawa tokols.

Hasil menunjukkan bahwa pada mencit yang diinduksi NTA (KP) memiliki kadar CSF-1 ginjal yang lebih rendah. Hal ini kemungkinan disebabkan karena KP mengalami NTA dimana pada kondisi ini akan terjadi penurunan fungsi ginjal sehingga terjadi proteinuria yang menyebabkan kadar protein mencit menjadi rendah. Pada kondisi rendahnya kadar protein yang tersedia dalam tubuh, CSF-1 tidak diproduksi oleh makrofag sehingga setelah terjadi inflamasi akan terjadi kematian sel.<sup>31</sup> Ketika NTA, terjadi kerusakan sel seperti nekrosis dimana ketika proses kerusakan sel masih berlangsung, tubuh belum melakukan respon perbaikan sel melalui ekspresi CSF-1 sehingga kadar CSF-1 KP lebih rendah, sedangkan pada kondisi normal CSF-1 tetap diproduksi untuk melakukan proliferasi sel maupun regenerasi sel secara fisiologis.

Hasil uji statistik menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antara KP dengan P3 namun tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara P3 dan KN. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian CPO dengan dosis 0,14 mg/gBB berhasil meningkatkan kadar CSF-1 ginjal hingga mendekati kondisi normal. Namun, peningkatan dosis CPO menjadi 0,21 mg/gBB tidak menunjukkan perbedaan kadar CSF-1 yang signifikan jika dibandingkan dengan KP, dengan kata lain efek yang ditimbulkan tidak lebih baik. Hal ini juga terjadi pada kelompok perlakuan mikrosfer kitosan CPO dimana pemberian CPO dengan dosis 0,071 mg/gBB menunjukkan peningkatan kadar CSF-1 mendekati

kondisi normal dimana peningkatan dosis CPO menjadi 0,107 mg/gBB dalam mikrosfer kitosan tidak menunjukkan efek yang lebih baik.

Berdasarkan penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa dosis optimal CPO untuk mencegah gangguan ginjal akibat kondisi diabetes adalah sebesar 0,14 mg/gBB dimana peningkatan dosis menjadi dua kalinya tidak menunjukkan efek yang lebih baik.<sup>32</sup> Hal ini diperkuat dengan hasil penelitian saat ini yang diperoleh dimana peningkatan dosis CPO menjadi 0,21 mg/gBB juga tidak menunjukkan efek peningkatan CSF-1 yang lebih baik. Namun, hal ini juga terjadi pada kelompok perlakuan mikrosfer kitosan CPO walaupun dosis CPO yang diberikan dalam mikrosfer kitosan tidak setara dengan dosis CPO yang diberikan tanpa pembawa. Hal ini kemungkinan juga disebabkan karena CPO dengan dosis 0,071 mg/gBB dalam mikrosfer kitosan merupakan dosis optimal CPO dalam mikrosfer kitosan. Sifat mikrosfer kitosan yang mampu menghantarkan CPO ke ginjal memungkinkan terjadinya akumulasi CPO yang lebih banyak di ginjal sehingga pemberian mikrosfer kitosan CPO memiliki dosis optimum yang berbeda dengan dosis optimum CPO tanpa pembawa. Namun, untuk menyimpulkan dosis optimum mikrosfer kitosan CPO diperlukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan variasi dosis mikrosfer yang lebih beragam.

Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan penggunaan fraksi tinggi tokotrienol (*Tokotrienol Rich Fraction/TRF*) pada sel neuron yang telah diinduksi sitotoksik dengan glutamat memiliki laju proliferasi yang paling tinggi pada pemberian TRF dengan dosis 200 ng/mL dimana pemberian TRF dosis 100 dan 300 ng/mL menunjukkan persentase proliferasi sel yang lebih rendah.<sup>33</sup> Penelitian lain juga menunjukkan bahwa tokotrienol memiliki efek untuk menghambat proliferasi sel kanker dan menginduksi apoptosis dari sel kanker dengan  $IC_{50}$  untuk sel HeLa dari  $\delta$ -tokotrienol adalah  $> 100 \mu\text{M}$  atau setara dengan  $> 42,47 \mu\text{g/mL}$  dimana terdapat pula efek apoptosis yang ditimbulkan pada sel normal meskipun sangat minimal.<sup>34</sup> Data ini menunjukkan bahwa pemberian tokols dengan dosis berebih tidak menunjukkan aktivitas perbaikan sel yang lebih baik. Hal ini kemungkinan disebabkan karena pada dosis tertentu yang berlebihan, tokols mampu menimbulkan efek sitotoksik sehingga proses proliferasi ataupun perbaikan sel melalui peningkatan kadar CSF-1 terganggu. Akibatnya, ditemukan kadar CSF-1 ginjal yang lebih rendah pada pemberian dosis CPO yang lebih tinggi. Namun, tidak dapat dilakukan perbandingan

antara dosis sitotoksik pada literatur dengan dosis tokotrienol dalam CPO yang diberikan ke mencit karena penelitian sebelumnya melakukan studi secara *in vitro*.

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan kadar CSF-1 yang signifikan antara P1 dan P3 dimana P1 adalah kelompok perlakuan CPO dengan dosis 0,071 mg/gBB dalam mikrosfer kitosan dan P3 adalah kelompok perlakuan CPO dengan dosis 0,14 mg/gBB. Melalui hasil ini dapat terlihat bahwa mikrosfer kitosan CPO mampu memberikan efek yang tidak berbeda signifikan terhadap peningkatan kadar CSF-1 jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan CPO tanpa pembawa meskipun dosis CPO yang diberikan lebih rendah. Namun, tidak dapat ditarik kesimpulan mengenai efektivitas mikrosfer kitosan untuk meningkatkan efek terapi CPO karena dalam penelitian ini dosis CPO yang diberikan antara P1 dan P3 tidak setara. Selain itu, tidak diketahui secara akurat kadar CPO yang terperangkap dalam mikrosfer kitosan sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut dengan mengukur persen penyerapan mikrosfer kitosan terhadap CPO.

CPO dalam bentuk mikrosfer dengan kitosan BMR sebagai pembawa dapat menghantarkan CPO ke ginjal karena kitosan BMR yang dihasilkan dari penelitian ini masih lebih rendah dari batas berat molekul protein yang diterima oleh ginjal, yaitu  $< 60 \text{ kDa}$  sehingga mikrosfer mudah untuk masuk ke ginjal. Kitosan BMR juga dapat ditangkap oleh tubulus proksimal melalui megalin sehingga mikrosfer kitosan ini dapat menghantarkan CPO ke tubulus proksimal yang mengalami kerusakan akibat gentamicin. Pelepasan CPO dari mikrosfer kitosan terjadi setelah mikrosfer kitosan mengalami kontak dengan air sehingga terjadi penetrasi air ke dalam sistem partikel dan menyebabkan terjadinya pengembangan polimer. Akibatnya, CPO berdifusi dan keluar dari sistem mikrosfer. Pengeluaran CPO dari mikrosfer kitosan terjadi secara perlahan dan kemudian menjadi semakin cepat.<sup>35</sup> Setelah CPO keluar dari sistem mikrosfer maka komponen senyawa tokols akan bekerja dan menimbulkan efek antioksidan untuk mencegah kerusakan sel lebih lanjut dan menginduksi perbaikan sel.

Melalui data hasil penelitian ini yang telah dianalisis maka dapat disimpulkan bahwa pemberian minyak kelapa sawit dengan dosis 0,071 mg/gBB dalam mikrosfer kitosan mampu meningkatkan kadar CSF-1 di ginjal secara signifikan apabila dibandingkan dengan hewan coba model NTA tanpa pemberian apapun. Namun peningkatan dosis minyak kelapa sawit menjadi 0,107 mg/gBB dalam mikrosfer kitosan tidak

menunjukkan perbedaan kadar CSF-1 yang signifikan jika dibandingkan dengan hewan coba model NTA tanpa pemberian apapun.

#### UCAPAN TERIMAKASIH

Melalui terselesaikannya penelitian ini, penulis mengucapkan terimakasih kepada Efta Triastuti, S. Farm., M. Farm Klin., Apt, dan dr. Mudjiwijoyo Handaru Eko, MS, Sp.PA selaku pembimbing yang selalu menyediakan waktu untuk memberikan saran-saran untuk menyelesaikan penelitian ini.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Rinawati W. dan Diana A. Kidney Injury Molecul-1 (KIM 1) sebagai Penanda Baru Nekrosis Tubular Akut. *Majalah Kedokteran Indonesia*, 2011, 61 (2): 81-85.
- Gill N., Joseph V. N., dan Richard A.F. Renal Failure Secondary to Acute Tubular Necrosis: Epidemiology, Diagnosis, and Management. *CHEST Journal*, 2005, 125 (4): 2847-2863.
- Rahman M., Fariha S., and Michael C. S. Acute Kidney Injury: A Guide to Diagnosis and Management. *American Family Physician*, 2012, 86 (7): 621-639.
- Ayu P. 2010, *Hubungan antara Beberapa Parameter Anemi dan Laju Filtrasi Glomerulus pada Penyakit Ginjal Kronik Pradialisis*. Diunduh dari: <http://unud.ac.id>. Diakses tanggal 12 September 2012.
- Dipiro, Joesph T. 2008. *Pharmacotherapy : A Pathophysiology Approach, Seventh Edition*. The McGraw-Hill Companies Inc, United States of America, p. 723-741.
- Sinto R dan Ginova N. Acute Kidney Injury: Pendekatan Klinis dan Tata Laksana. *Majalah Kedokteran Indonesia*, 2010, 60 (2): 81-88.
- Needham E. Management of Acute Renal Failure. *American Family Physician*, 2005, 72 (9): 1739-1746.
- Rajapakse S, Rodrigo C, and Wijewickrema E. Management of Sepsis-Induced Acute Kidney Injury. *Sri Lanka Journal of Critical Care*, 2009, 1 (1): 3-14.
- Nurani VM dan Sulis M. 2013. Gambaran Makna Hidup Pasien Gagal Ginjal Kronik yang Menjalani Hemodialisa. *Jurnal Psikologi*, 2013, 11 (1): 1-13.
- Musa I., Huzwah K. M., Sokhini A. M. Palm Oil Tocotrienols and Its Potential Against Alzheimer's Disease and Brain Ischemia. *International Journal of Biomedical and Advance Research*, 2012, 3 (9): 670-677.
- Dryer S. E. Glutamate Receptors in The Kidney. *Oxford University Press*, 2015, 30 (10): 1630-1638.
- Luo J., Fiona E., Markus B., Saul V., Hui Z., Zhaoqing D., et al. Colony-Stimulating Factor 1 Receptor (CSF1R) Signaling in Injured Neurons Facilitates Protection And Survival. *Journal Experimental Medicine*, 2013, 210 (1): 157-172.
- Menke J., Yasunori I., Whitney A. R., Ranu B., Yee G. Y., Benjamin D. H., et al. CSF-1 Signals Directly to Renal Tubular Epithelial Cells to Mediate Repair in Mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 2009, 119 (8): 2330-2342.
- Menke J., Yasunori I., Whitney A. R., Ranu B., Yee G. Y., Benjamin D. H., et al. CSF-1 Signals Directly to Renal Tubular Epithelial Cells to Mediate Repair in Mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 2009, 119 (8): 2330-2342.
- Chou C. K., Shih M. C., Yi C. L., Tzu C. H., Jen A. L. Low-Molecular-Weight Chitosan Scavenges Methylglyoxal and N $\epsilon$ -(Carboxyethyl) Lysine, The Major Factors Contributing to The Pathogenesis of Nephropathy. *Springer Plus*, 2015, 4 (312): 1-7.
- Sharma M. Applications of Nanotechnology Based Dosage Forms for Delivery of Herbal Drugs. *Research and Reviews: Journal of Pharmaceutics and Nanotechnology*, 2014, 2 (1): 23-30.
- Sinha VR, Singla AK, Wadhawan S, Kaushik R, Kumria R. Chitosan Microspheres as a Potential Carrier for Drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 2004, 274: 1-33.
- Chandrasekaram K. 2009. *Analysis of Phytonutrients from Palm Concentrates by High Performance Liquid Chromatography*. Thesis. Not Published, Faculty of Science University of Malaya, Kuala Lumpur.
- Bele A. A. and Anubha K. An Overview on Thin Layer Chromatography. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2011, 2(2): 256-267.
- Paramita ID, Ressa PD, dan Aji P. Kinetika Reaksi Hidrolisa LMWC dengan HCl. *Jurnal Teknik Kimia dan Industri*, 2012, 1 (1): 513-520.
- Qinna NA, Qutuba GK, Nawzat A, Mayyas AA, Tawfiq MA, Khaldoun AA, et al. Influence of Molecular Weight and Degree of Deacetylation of Low Molecular Weight Chitosan on the Bioactivity of Oral Insulin Preparations. *Marine Drugs*, 2015, 13: 1710-1725.

22. Pearce EM, Bob AH, Richard AP, Gennady EZ. 2015. *Physical Chemistry Research for Engineering and Applied Science Volume 1*. Apple Academy press, Canada.
23. Kumar S. S., Saha A. K., Kavitha K., and Basu S. K. Evaluation of Clobazam Loaded Ionically Cross-Linked Microspheres Using Chitosan. *Der Pharmacia Sinica*, 2012, 3 (6): 616-623.
24. Marzuki I. 2012. *Pelepasan Terkendali Kalium Klorida dalam Mikrosfer Kitosan dengan Metode Tautan Silang*. Tugas Akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Teknik UI, Depok.
25. Yuan Z. X., Jing J. L., Xun S., Tao G., dan Zhi R. Z. Enhanced Accumulation of Low Molecular Weight Chitosan in Kidneys: A Study on The Influence of N-Acetylation of Chitosan on The Renal Targeting. *Journal of Drug Targetting*, 2011, 19 (7): 540-551.
26. Manjula A., Selvam P., Nirmal R., dan Shakilabanu. In vitro Evaluation Studies of Crosslinked Chitosan Microspheres Contain Rabeprazole Sodium. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2011, 2 (6): 1513-1517.
27. Stein M., 2013. Radiopaque, Bioresorbable Embolic Microspheres: An Animal Study to Demonstrate Feasibility and Short Term Data. (Abstract). *Colombia Radiology Corp*, 483: 208.
28. Singh V. K., Lindsay A. B., and Thomas M. S. Vitamin E: Tocopherols and Tocotrienols as Potential Radiation Countermeasures. *Journal of Radiation Research*, 2013, 54: 973-988.
29. Leonard S. W., Eric G., Michael W. D., Ronald J. S., and Maret G. T. Quantitation of Rat Liver Vitamin E Metabolites by LC-MS During High-Dose Vitamin E Administration. *Journal of Lipid Research*, 2005, Volume 46: 1068-1075.
30. Fairus S., Rosnah M. N., Hwee M. C., and Kalyana S. Alpha-Tocotrienol is The Most Abundant Tocotrienol Isomer Circulated in Plasma and Lipoproteins after Postprandial Tocotrienol-Rich Vitamin E Supplementation. *Nutrition Journal* 2012, 11 (5): 1-11.
31. Hume D. A and Kelli P. A. M. Therapeutic Applications of Macrophage Colony-Stimulating Factor-1 (CSF-1) and Antagonists of CSF-1 Receptor (CSF-1R) Signaling. *The American Society of Hematology*, 2012, Vol. 119 No. 8.
32. Tan R., Mohamed S., Samaneh G. F., Noordin M., Goh Y. M., dan Manap M. Y. A. Polyphenol Rich Oil Palm Leaves Extract Reduce Hyperglycaemia and Lipid Oxidation in STZ-Rats. *International Food Research Journal*, 2011, 18: 179-188.
33. Selvaraju T. R., Thilaga R. S., Huzwah K., Sharmili V., Mohd S. A. M., and Ramachandran V. The Neuroprotective Effects of Tocotrienol Rich Fraction and Alpha Tocopherol Against Glutamate Injury in Astrocytes. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 2014, 14 (4):195-204.
34. Zhang C. S., Da-Ming L., YueMa, Ning H., Qing G., Feng-Shan W., Shu-Qing J., Bing-Qing C., and Jia-Ren L. C-Tocotrienol Induces Paraptosis-Like Cell Death in Human Colon Carcinoma SW620 Cells. *Public Library of Science*, 2013, 8 (2): 1-13.
35. Mitra A and Baisakhi D. Chitosan Microspheres in Novel Drug Delivery Systems. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2011, 73 (4): 355-366.