

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

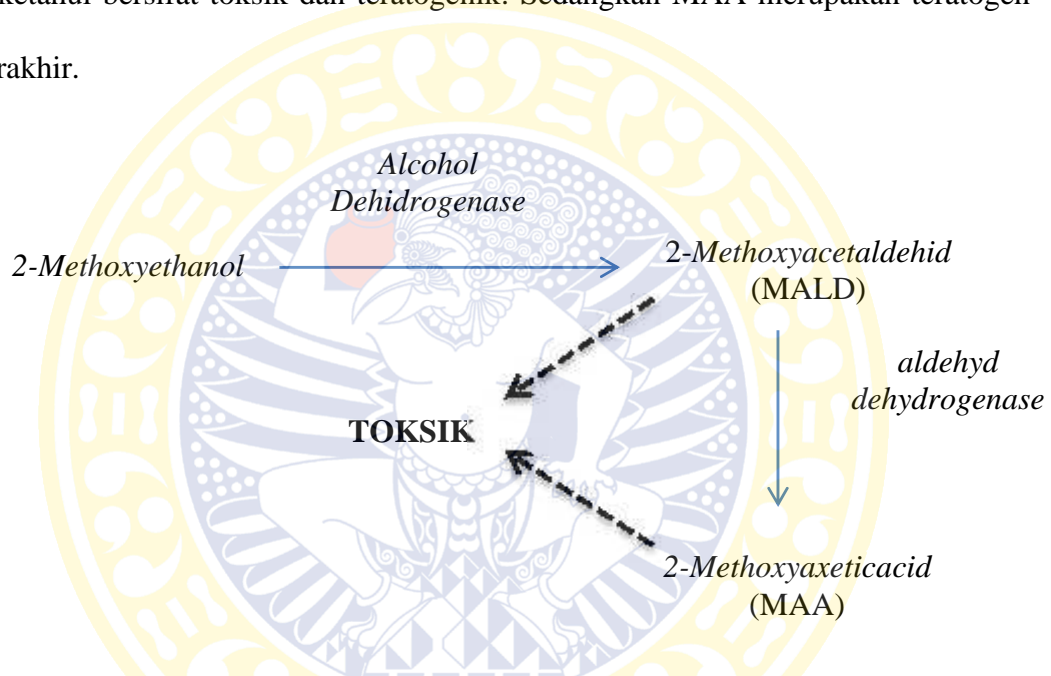
2.1 Tinjauan Umum 2-Methoxyethanol

Senyawa 2-ME (*2-Methoxyethanol*) yang bersinonim dengan EGME (*ethylene glycol monomethyl ether*) merupakan metabolit dari hidrolisis *dimethoxyethylphthalat* (DMEP). DMEP yang merupakan kelompok *phthalic acid ester* (PAEs) banyak digunakan sebagai *plasticizer* dalam pembuatan plastik. Senyawa ini mempunyai rumus kimia $\text{CH}_3\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$ dan bernomor molekul $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_2$.

2-Methoxyethanol merupakan senyawa yang tidak berwarna, berupa cairan yang dapat terbakar. *2-Methoxyethanol* tidak dihasilkan secara alami tetapi dihasilkan dalam jumlah besar oleh banyak perusahaan di bidang industri. Dalam bidang industri senyawa ini digunakan untuk pelarut selulosa asetat, pelarut cat, pelarut pernis, cat kuku, pewarna kayu. *2-Methoxyethanol* juga terdapat pada peralatan rumah tangga, mainan anak-anak dan peralatan kedokteran atau kesehatan.

2-Methoxyethanol masuk ke tubuh ketika udara yang kita hirup atau makanan dan minuman yang kita konsumsi terkontaminasi 2-ME dan juga terabsorpsi kulit. Selain itu senyawa 2-ME secara cepat disebarkan oleh darah ke semua sel dan jaringan kecuali jaringan adiposa (lemak), karena senyawa ini tidak larut dalam lemak. Pengaruh 2-ME terhadap kesehatan tergantung pada lama waktu dan frekuensi pemaparan. Juga dipengaruhi oleh kesehatan individu dan kondisi lingkungan ketika pemaparan terjadi.

Metabolit 2-ME dalam tubuh manusia berupa asam metoksiasetat (MAA), dapat menyebabkan efek teratogenik dan toksik terhadap organ tubuh. Dalam tubuh organisme, dengan katalisator *alcohol dehydrogenase*, 2-ME mengalami metabolisme menjadi senyawa metabolit *2-Methoxyacetaldehid* (MALD). MALD dioksidasi lebih lanjut (biotransformasi) menjadi *2-methoxyaxeticacid* (MAA) dengan katalisator *aldehyd dehydrogenase*. Senyawa metabolit MALD dan MAA diketahui bersifat toksik dan teratogenik. Sedangkan MAA merupakan teratogen terakhir.



Gambar 2.1 Skema metabolisme dan biotransformasi 2-ME (Subani, 2013)

Senyawa 2-ME yang digunakan masyarakat merupakan hasil produksi dari industri kimia. Di alam, senyawa 2-ME merupakan senyawa hasil hidrolisis dari *ethylene glycol monomethyl ether acetat* (EGMEA) yang dikatalis oleh *carboxyl esterase*. Pada mamalia, proses ini terjadi di sel hati, ginjal, paru-paru, dan darah.

Mekanisme toksisitas MAA sebagai hasil metabolisme 2-ME adalah melalui peningkatan permeabilitas membran sel. Keadaan ini mengakibatkan

influks Ca^{2+} menjadi berlebih (Ca^{2+} *overload*), sehingga mengganggu keseimbangan di dalam sitoplasma sel. Keadaan ini mengakibatkan kerusakan hingga kematian sel. Disamping itu juga terjadi pengaktifan enzim protease dan fosfolipase yang dapat mendegradasi protein-protein sitoskelet yang diperlukan dalam membangun struktur sel.

2.2 Radikal bebas dan *Reactive Oxygen Species* (ROS)

Radikal bebas adalah atom atau gugus apa saja yang memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan. Karena jumlah elektron ganjil, maka tidak semua elektron dapat berpasangan. Suatu radikal bebas dapat bermuatan positif atau negatif, maka spesies semacam ini sangat reaktif karena adanya elektron tidak berpasangan. Sumber radikal bebas dapat berasal dari dalam tubuh kita sendiri (endogen) yang terbentuk sebagai sisa proses metabolisme (proses pembakaran), protein, karbohidrat, dan lemak yang kita konsumsi.

Radikal bebas dapat pula diperoleh luar tubuh (eksogen) yang berasal dari polusi udara, asap kendaraan, berbagai bahan kimia, makanan, yang telah hangus (*carbonated*). Radikal bebas yang terbentuk di dalam tubuh akan merusak sel target seperti lemak, protein, karbohidrat dan DNA.

Ada dua bentuk umum dari radikal bebas yaitu *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan *Reactive Nitrogen Species* (RNS). ROS adalah senyawa pengoksidasi turunan oksigen yang bersifat sangat reaktif. Di dalam sel, sumber utama ROS adalah *anion superoxide* dan *hydrogen* yang terbentuk sebagai produk samping

metabolisme seluler seperti oksidasi fosforilasi dalam mitokondria (Waris dan Ahsan, 2006).

Radikal bebas punya 2 sifat penting yaitu: 1) bersifat sangat reaktif dan cenderung untuk bereaksi dengan molekul lain untuk mencari pasangan elektronnya sehingga bentuk lebih stabil. 2) dapat mengubah molekul menjadi radikal. Radikal bebas mirip dengan oksidan dalam sifatnya sebagai penerima elektron (menarik elektron). Radikal bebas lebih berbahaya daripada oksidan oleh karena reaktifitas yang tinggi dan kecenderungannya membentuk radikal bebas yang baru. Radikal bebas apabila bertemu dengan molekul lain akan membentuk radikal bebas yang baru lagi dan seterusnya sehingga terjadi reaksi rantai (Gupta, 2007).

Beberapa kondisi termasuk berkurangnya ATP, peningkatan level stres oksidatif, dan pembentukan ROS yang berlebihan, pada akhirnya memicu terjadinya kematian sel melalui peningkatan *pathway apoptotic internal*, yaitu didahului dengan *mitochondrial permeability transition* (MPT) yang menyebabkan hilangnya potensial membran mitokondria. Kebocoran ini menyebabkan depolarisasi membran mitokondria dan lepasnya matrik mitokondria seperti *apoptotic inducing factor* (AIF) yang mengaktifkan *apoptotic effector caspase* dan *cytochrome c* ke sitoplasma. *Cytochrome c* berinteraksi dengan kofaktor protein Apaf-1 dan caspase-9 untuk mengaktifkan caspase-3. Kemudian, dengan menggunakan energi dari ATP, ikatan matrik membentuk apoptosome yang menghasilkan apoptosis.

Variasi konten DNA pada mitokondria berpengaruh terhadap perilaku sel seperti sensitifitas terhadap bahan toksik, ketergantungan hormon, potensi invasi dan metastase sel, pertumbuhan sel, dan juga kematian sel secara terprogram (apoptosis) (Yu *et al.*, 2011). Hal ini didukung dengan laporan bahwa paparan 2-*Methoxyethanol* mengakibatkan apoptosis pada sel dengan DNA mitokondria yang utuh (Jella *et al.*, 2013). Sebaliknya, sel yang kekurangan DNA pada mitokondria (0) cenderung sedikit mengalami apoptosis dan nekrosis.

2.2.1 Mekanisme kerja radikal bebas, peroksidasi lipid, dan malondialdehyde (MDA)

Disamping dihasilkan secara tetap pada makhluk hidup sebagai produk sampingan dari metabolisme sel, ROS juga dihasilkan sebagai konsekuensi dari radiasi, obat-obatan kemoterapi dan paparan lingkungan terhadap oksidan kimia dan logam transisi. Pada kadar normal, ROS bekerja sebagai *redox messenger* yang terlibat dalam beberapa regulasi dan *pathway* sinyal transduksi intra sel. Peningkatan ROS pada level sedang masih memungkinkan terjadinya proliferasi sel. Pada konsentrasi yang tinggi atau jumlah yang berlebihan, ROS bertindak sebagai stres oksidatif yang menyebabkan kerusakan oksidatif pada lemak, protein dan DNA, memicu transformasi onkogenik, meningkatkan aktifitas metabolik dan disfungsi mitokondria.

Radikal bebas dapat menimbulkan perubahan kimia dan kerusakan terhadap protein, lemak, karbohidrat, dan nukleotida. Bila radikal bebas diproduksi secara *in vivo*, atau *in vitro* di dalam sel melebihi mekanisme pertahanan normal, maka akan terjadi berbagai gangguan metabolik dan seluler.

Jika posisi radikal bebas yang terbentuk dekat dengan DNA, maka bisa menyebabkan perubahan struktur DNA sehingga bisa terjadi mutasi atau sitotoksisitas. Radikal bebas juga bisa bereaksi dengan nukleotida sehingga menyebabkan perubahan yang signifikan pada komponen biologi sel. Bila radikal bebas merusak grup *thiol* maka akan terjadi perubahan aktivitas enzim. Radikal bebas dapat merusak sel dengan cara merusak membran sel tersebut. Kerusakan pada membran sel ini dapat terjadi dengan cara:

- a) radikal bebas berikatan secara kovalen dengan enzim dan/atau reseptor yang berada di membran sel, sehingga merubah aktivitas komponen-komponen yang terdapat pada membran sel tersebut;
- b) radikal bebas berikatan secara kovalen dengan komponen membran sel, sehingga merubah struktur membran dan mengakibatkan perubahan fungsi membran dan/atau mengubah karakter membran menjadi seperti antigen;
- c) radikal bebas mengganggu sistem transport membran sel melalui ikatan kovalen, mengoksidasi kelompok *thiol*.
- d) radikal bebas menginisiasi peroksidasi lipid secara langsung terhadap asam lemak pada dinding sel. Radikal bebas akan menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid membran sel. Peroksida lipid akan terbentuk dalam rantai yang makin panjang dan dapat merusak organisasi membran sel. Peroksidasi ini akan mempengaruhi fluiditas membran, *cross-linking* membran, serta struktur dan fungsi membran.

Mekanisme kerusakan sel atau jaringan akibat serangan radikal bebas yang paling awal diketahui dan terbanyak diteliti adalah peroksidasi lipid. Peroksidasi

lipid paling banyak terjadi di membran sel, terutama asam lemak tidak jenuh yang merupakan komponen penting penyusun membran sel. Pengukuran tingkat peroksidasi lipid diukur dengan mengukur produk akhirnya, yaitu *malondialdehyde* (MDA), yang merupakan produk pembusukan peroksidasi lipid yang berupa aldehyd reaktif, dan merupakan salah satu dari banyak spesies elektrofil reaktif yang menyebabkan stres oksidatif pada sel, dan membentuk produk protein kovalen yang dikenal dengan sebutan *advance lipoxidation end products* (ALE)

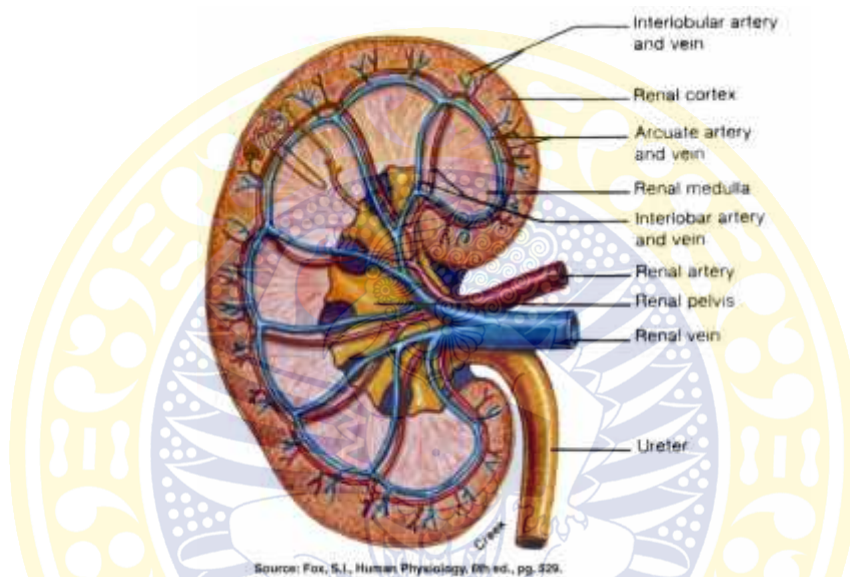
2.3 Ginjal

2.3.1 Anatomi dan Histologi Ginjal

Ginjal adalah suatu organ yang secara struktural kompleks dan berkembang untuk beberapa fungsi: ekskresi produk sisa metabolisme, pengendalian air dan garam, pemeliharaan keseimbangan asam dan basa, serta sekresi berbagai hormon dan autokoid (Cotran *et al.*, 2007). Walaupun mempunyai banyak fungsi, fungsi primer ginjal adalah mempertahankan volume dan komposisi cairan ekstraseluler dalam batas-batas normal (Wilson, 2005).

Ginjal merupakan organ yang besar, berjumlah sepasang, berwarna kemerahan, berbentuk seperti kacang, dan terletak dalam retroperitoneum pada dinding posterior abdomen. Posisi hati menyebabkan letak ginjal kanan berada sekitar 1-2 cm lebih rendah dibandingkan ginjal kiri. Masing-masing ginjal memiliki berat 130-150 g; dengan ukuran panjang sekitar 11 cm, lebar sekitar 4-5 cm, dan tebal sekitar 3 cm (Gartner dan Hiatt, 2007). Permukaan ginjal halus dan terdapat di dalam suatu kapsul yang dikelilingi oleh lemak perinefrik dan fascia

Gerota (Chandrasoma dan Clive, 2005). Pada keadaan pembesaran massa ginjal dapat ditandai dengan pergeseran lemak perinefrik (Effendi dan Markum, 2007). Ginjal juga memiliki sisi medial cekung dan permukaan lateral yang cembung. Sisi medial yang cekung, hilum, merupakan tempat masuknya saraf, keluar dan masuk pembuluh darah dan pembuluh limfe, serta keluarnya ureter (Junqueira *et al.*, 2005).



Gambar 2.2 Struktur umum ginjal (Focosi, 2009).

Setiap ginjal dibagi dalam korteks di bagian luar yang tercat gelap dalam preparat mikroskopis dan medula di bagian dalam yang tercat lebih terang. Korteks ginjal terdiri atas pars konvoluta dan pars radiata. Pars konvoluta/kontorta tersusun dari korpuskuli ginjal dan tubuli yang membentuk labirin kortikal. Pars radiata tersusun atas bagian-bagian lurus (segmen lurus tubulus proksimal dan segmen lurus tubulus distal) dari nefron dan duktus koligens. Massa jaringan korteks yang mengelilingi setiap piramid medula membentuk sebuah lobus renis, dan setiap berkas medula merupakan pusat dari lobulus renis. Jaringan korteks

juga terdapat di antara piramid medula, yang disebut kolumna Bertin (Gartner dan Hiatt, 2007; Stevens *et al.*, 2005).

Medula ginjal terdiri atas 10-18 struktur berbentuk kerucut atau piramidal, yaitu piramid medula. Dari dasar setiap piramid medulla terjulur berkas-berkas tubulus paralel, berkas medula, yang menyusup ke dalam korteks. Setiap berkas medula terdiri atas satu atau lebih duktus koligens bersama bagian lurus beberapa nefron (Junqueira *et al.*, 2005). Unit fungsional ginjal adalah nefron. Setiap ginjal terdiri atas 1-4 juta nefron. Setiap nefron terdiri atas bagian yang melebar, korpuskulus ginjal; tubulus kontortus proksimal; segmen tebal dan tipis lengkung Henle; serta tubulus kontortus distal (Junqueira *et al.*, 2005).

Korpuskulus ginjal berdiameter sekitar 200-250 μm dan terdiri atas seberkas kapiler, yaitu glomerulus, dikelilingi oleh kapsula epitel ber dinding ganda yang disebut kapsula bowman. Ruangan dalam kapsula bowman disebut ruang bowman (ruang urinarius) yang menampung cairan yang disaring melalui dinding kapiler dan lapisan viseral. Glomerulus berhubungan dengan kapsula bowman di bagian dalam melalui lapisan viseral yang tersusun oleh modifikasi sel-sel epitel yang disebut podosit. Dinding luar yang mengelilingi ruang bowman tersusun oleh sel-sel epitel skuamous simpleks yang membentuk lapisan parietal (Gartner dan Hiatt, 2007). Masing-masing korpuskulus renal juga memiliki kutub vaskuler dan kutub urinarius. Kutub vaskuler merupakan tempat arteriol aferen masuk dan arteriol eferen keluar, sedangkan kutub urinarius merupakan tempat dimulainya tubulus kontortus proksimal (Junqueira *et al.*, 2005). Barrier antara sirkulasi darah di kutub vaskuler dan ruang urinarius disebut barrier filtrasi

glomerulus. Struktur ini terdiri atas lapisan dalam kapiler endotel, membran basalis kapiler glomerulus tebal yang khas, dan lapisan podosit (Stevens *et al.*, 2005).

Glomerulus merupakan struktur yang dibentuk oleh beberapa berkas anastomosis kapiler yang berasal dari cabang-cabang arteriol aferen. Komponen jaringan ikat pada arteriol aferen tidak masuk ke dalam kapsula bowman, dan secara normal sel-sel jaringan ikat digantikan oleh tipe sel khusus, yaitu sel-sel mesangial. Ada dua kelompok sel-sel mesangial, yaitu sel-sel mesangial ekstraglomerular yang terletak pada kutub vaskuler dan sel-sel mesangial intraglomerular mirip perisit yang terletak di dalam korpuskulus ginjal (Gartner dan Hiatt, 2007).

Pada kutub urinarius dari korpuskulus ginjal, epitel skuamous dari lapisan parietal kapsula bowman berhubungan langsung dengan epitel silindris dari tubulus kontortus proksimal (Junqueira *et al.*, 2005). Tubulus kontortus proksimal terdapat banyak pada korteks ginjal dengan diameter sekitar 60 μm dan panjang sekitar 14 mm. Tubulus kontortus proksimal terdiri dari pars konvoluta yang berada di dekat korpuskulus ginjal dan pars rekta yang berjalan turun di medula dan korteks, kemudian berlanjut menjadi lengkung henle di medulla (Gartner dan Hiatt, 2007). Epitel yang melapisi tubulus ini adalah selapis kuboid yang menunjang dalam mekanisme absorpsi dan ekskresi. Pada sel-sel tubulus kontortus proksimal lumen cenderung lebih sempit daripada tubulus kontortus distal dikarenakan sel kuboid cenderung berbentuk seperti piramid. Sel-sel epitel ini memiliki sitoplasma asidofilik yang disebabkan oleh adanya mitokondria

panjang dalam jumlah besar. Apeks sel memiliki banyak mikrovili dengan panjang sekitar 1 μm , yang membentuk suatu *brush border* (Guyton dan Hall, 2007; Junqueira *et al.*, 2005).

Lengkung Henle adalah struktur berbentuk “U” terdiri atas ruas tebal desenden, dengan struktur yang sangat mirip tubulus kontortus proksimal; sedangkan ruas tipis desenden, ruas tipis asenden, dan ruas tebal asenden, dengan struktur yang sangat mirip tubulus kontortus distal. Pada medula bagian luar, ruas tebal desenden, dengan garis tengah luar sekitar 60 μm , secara mendadak menipis sampai sekitar 12 μm dan berlanjut sebagai ruas tipis desenden. Lumen ruas nefron ini lebar karena dindingnya terdiri atas sel epitel gepeng yang intinya hanya sedikit menonjol ke dalam lumen. Bila ruas tebal asenden lengkung Henle menerobos korteks, struktur histologisnya tetap terpelihara tetapi menjadi berkelok-kelok disebut tubulus kontortus distal, yaitu bagian terakhir nefron. Tubulus ini dilapisi oleh sel-sel epitel selapis kuboid (Junqueira *et al.*, 2005).

Sel epitel tubulus sangat peka dan rentan terhadap zat toksik. Beberapa faktor memudahkan tubulus mengalami toksik, termasuk permukaan bermuatan listrik yang luas untuk reabsorpsi tubulus, sistem transpor aktif untuk ion dan asam organik, dan kemampuan melakukan pemekatan secara efektif, selain itu kadar sitokrom P₄₅₀ yang tinggi untuk mendetoksifikasi atau mengaktifkan toksikan. Pada nefrotoksik akibat parasetamol dapat menyebabkan nekrosis tubulus akut di mana nekrosis paling mencolok terlihat pada tubulus kontortus proksimal, namun membran basal tubulus umumnya tidak terkena (Cotran *et al.*, 2007).

2.3.2 Fisiologi ginjal

Ginjal mengatur komposisi kimia dari lingkungan dalam melalui suatu proses majemuk yang melibatkan filtrasi, absorpsi aktif, absorpsi pasif dan sekresi. Filtrasi terjadi dalam glomerulus, tempat ultrafiltrat dari plasma darah terbentuk. Tubulus nefron terutama tubulus proksimal mengabsorpsi zat-zat dalam substrat yang berguna bagi metabolisme tubuh, sehingga memelihara homeostatis lingkungan dalam (Junqueira dan Carneiro, 2007). Filtrasi memindahkan produk sisa tertentu dari darah ke dalam lumen tubulus, yang dikeluarkan bersama urin. Dalam keadaan tertentu, dinding duktus koligens dapat ditembus air, sehingga membantu memekatkan urin yang umumnya hipertonik terhadap plasma darah. Dengan cara ini, organisme mengatur air, cairan interselular dan keseimbangan osmotik (Junqueira dan Carneiro, 2007). Ginjal merupakan alat tubuh yang strukturnya amat rumit, berperan penting dalam pengelolaan berbagai faal utama tubuh. Beberapa fungsi ginjal :

1. Regulasi volume dan osmolalitas cairan tubuh.

Bila tubuh kelebihan cairan maka terdapat rangsangan melalui arteri karotis interna ke osmoreseptor di hipotalamus anterior. Rangsangan tersebut diteruskan ke kelenjar hipotalamus posterior sehingga produksi hormon anti diuretik (ADH) dikurangi dan akibatnya diuresis banyak.

2. Regulasi keseimbangan elektrolit

Untuk mempertahankan homeostasis, ekskresi air dan elektrolit seharusnya sesuai dengan asupan. Jika asupan melebihi ekskresi, jumlah zat dalam tubuh meningkat. Jika asupan kurang dari ekskresi, jumlah zat dalam tubuh berkurang.

3. Regulasi keseimbangan asam basa

Ginjal turut mengatur asam-basa, bersama dengan sistem dapar paru dan cairan tubuh, dengan mengekskresi asam dan mengatur penyimpanan cairan tubuh.

4. Ekskresi produk metabolit dan substansi asing

Ginjal merupakan organ utama untuk membuang produk sisa metabolisme yang tidak diperlukan lagi oleh tubuh, seperti urea (dari metabolisme 20 asam amino), kreatinin (dari kreatin otot), asam urat (dari asam nukleat), produk akhir pemecahan hemoglobin (seperti bilirubin), dan metabolit dari berbagai hormon. Ginjal membuang banyak toksin dan zat asing lainnya yang diproduksi oleh tubuh atau pencernaan, seperti pestisida, obat-obatan dan makanan tambahan.

2.3.3 Efek toksikan pada ginjal

Efek toksik sangat bervariasi dalam sifat, organ sasaran, maupun mekanisme kerjanya. Toksisitas merupakan sifat bawaan suatu zat, bentuk dan tingkat manifestasi toksiknya pada suatu organisme bergantung pada berbagai jenis faktor. Efek toksik dapat berubah karena berbagai hal seperti perubahan absorpsi, distribusi dan ekskresi zat kimia, peningkatan atau pengurangan biotransformasi, serta perubahan kepekaan reseptor pada organ sasaran.

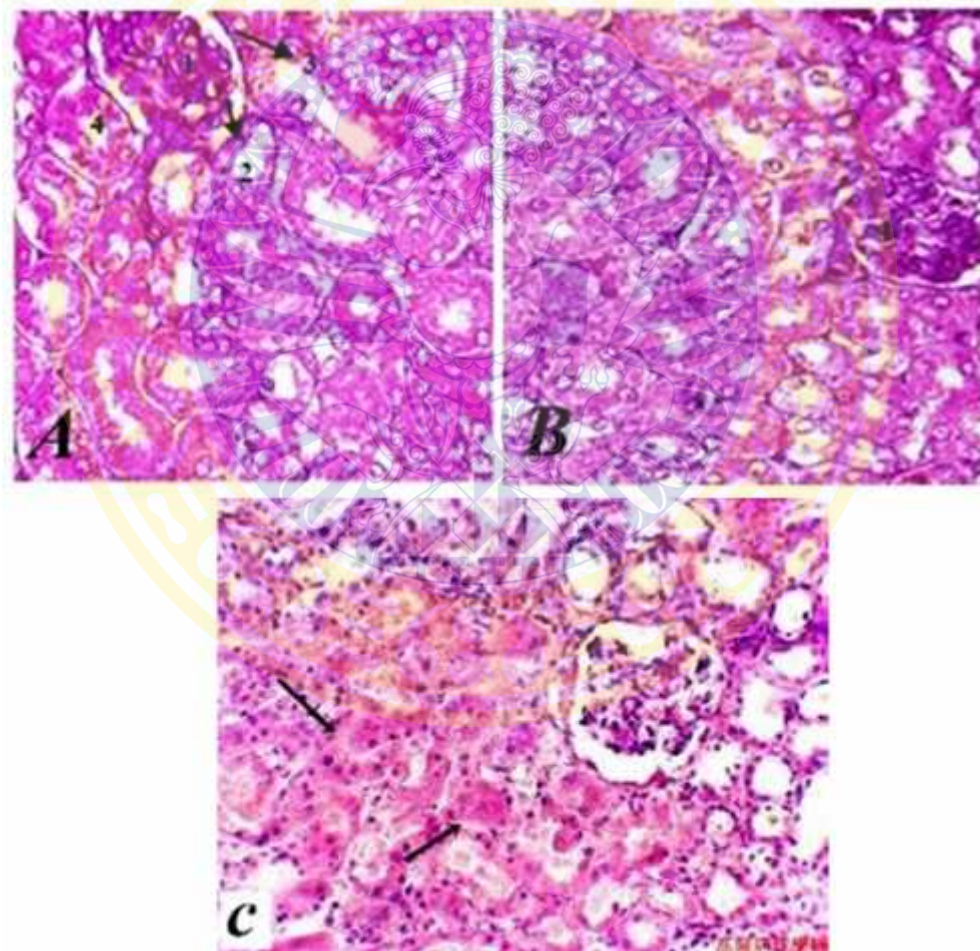
Ginjal merupakan organ yang sangat efisien dalam proses eliminasi zat-zat toksik dalam tubuh. Aliran darah ke ginjal yang tinggi dan peningkatan konsentrasi produk yang diekskresi diikuti reabsorpsi air dari cairan tubulus merupakan faktor utama yang terlibat dalam mempengaruhi kepekaan ginjal terhadap zat-zat toksik tersebut (Manggarwati dan Susilangingsih, 2010).

Toksisitas senyawa 2-ME yang masuk dalam tubuh terutama ginjal, mengakibatkan sel tubulus ginjal mengalami degenarasi sel dengan pembentukan vakuola besar, penimbunan lemak, dan nekrosis. Toksik ini langsung merusak struktur sel. Efek toksik yang demikian sering terlihat dalam jaringan hati dan ginjal, setelah senyawa mencapai konsentrasi yang tinggi dalam organ ini. Selain itu, 2-ME dapat mengakibatkan nekrosis atau kematian sel pada epitel glomerulus dan tubulus ginjal (Winaya dan Suarsana, 2005). Adanya nekrosis tersebut karena adanya kontak langsung antara racun yang diekskresi dalam urin dengan epitel-epitel sel tubulus ginjal.

Paparan *2-Methoxyethanol* yang berulang dapat menyebabkan terjadinya nekrosis tubular akut (NTA) nefrotoksik. Nekrosis tubular akut (NTA) bersifat reversible karena sel epitel dapat mengalami regenerasi sebagai bentuk aktivitas mitotik pada sel epitel tubulus yang masih ada. Kerusakan khas terletak pada tubulus proksimal yang ditandai dengan perubahan inti yaitu piknosis atau pengerutan inti, warna inti sel lebih gelap. Piknosis merupakan tahap awal kematian sel (nekrosis). Tahapan berikutnya yaitu karioreksis atau inti pecah menjadi fragmen-fragmen, dan kariolisis yaitu hilangnya inti. Apabila fungsi ginjal terganggu maka akan terjadi penumpukan bahan-bahan toksik seperti urea, asam urat, amoniak, kreatinin, ureum dan garam organik di tubulus kontortus proksimal ginjal.

Nekrosis tubular akut (NTA) merupakan penyebab terpenting dari gagal ginjal akut. Klinisnya adalah oliguria yang dilanjutkan dengan diuresis. Adanya kerusakan tubulus menyebabkan retensi cairan, sehingga terjadi uremia,

hiperkalemia, peningkatan *Blood Urea Nitrogen* (BUN) sekitar 25 sampai 30 mg/dl setiap hari, dan kreatinin meningkat kira-kira 2,5 mg/dl setiap hari (Price dan Wilson, 2005). Setelah penyembuhan, epitel tubulus diganti dengan sel yang belum memiliki kemampuan selektif, sehingga urin mudah lewat tanpa absorpsi yang mengakibatkan dehidrasi dan hilangnya elektrolit tertentu (Price dan Wilson, 2005; Alpers dan Fugo, 2007). Tampak pula peningkatan ketidakebalan terhadap infeksi sehingga kurang lebih 25% kematian akibat NTA terjadi selama fase diuretik.



Gambar 2.3 Gambaran struktur sel penyusun ginjal mencit (perbesaran 400x). Gambar A adalah gambaran ginjal normal; Gambar B adalah gambaran ginjal nekrosis tubular akut; Gambar C adalah degenerasi sel (Zakiyah *et al.*, 2012).

2.4 Tinjauan Tanaman Manggis (*Garcinia mangostana* L.)

2.4.1 Morfologi dan penyebaran

Garcinia mangostana L. merupakan nama Latin yang diberikan untuk tanaman manggis yang merupakan tanaman buah berupa pohon yang banyak tumbuh secara alami pada hutan tropis di kawasan Asia Tenggara seperti Indonesia, Malaysia, Thailand, Myanmar, Vietnam dan Kamboja (Hartanto, 2011). Manggis merupakan tumbuhan fungsional karena sebagian besar dari tumbuhan tersebut dimanfaatkan sebagai obat. Kulit buah manggis yang selama ini dibuang sebagai limbah ternyata memiliki segudang manfaat penting bagi kesehatan (Weecharansan *et al.*, 2006; Hartanto, 2011).

Klasifikasi botani buah manggis (Paramawati, 2010) adalah sebagai berikut :

Kingdom : Plantae
Divisi : Magnoliophyta
Class : Magnoliopsida
Ordo : Malpighiales
Family : Clusiaceae
Genus : *Garcinia*
Species : *Garcinia mangostana* L.

Tumbuhan manggis tersebar luas di Indonesia, baik di habitat alami maupun yang dibudidayakan, tumbuhan ini dapat ditemukan sampai ketinggian 600 m di atas permukaan laut dengan suhu rata-rata 20-30°C (Mardiana, 2011). Pohon mencapai tinggi 10-25 m. Diameter batang 25-35 cm dan kulit batang biasanya berwarna coklat gelap atau hampir hitam, kasar dan cenderung

mengelupas. Getah manggis berwarna kuning dan terdapat pada semua jaringan utama tanaman (Shabella, 2011). Daun manggis merupakan daun tunggal, lonjong, ujung runcing, pangkal tumpul, tepi rata, pertulangan menyirip, panjang 20-25 cm, lebar 6-9 cm, tebal, tangkai silindris, hijau.



Gambar 2.4 Buah Manggis (Wikipedia, 2016).

Buah manggis (Gambar 2.4) berbentuk bulat atau agak pipih dengan diameter 3,5-8 cm dan berwarna ungu tua karena mengandung banyak antosianin pada kulitnya (Obolskiy *et al.*, 2009). Daging buah manggis berwarna putih, bertekstur halus dan rasanya manis bercampur asam sehingga menimbulkan rasa khas dan segar. Berat buah bervariasi sekitar 75-150 g, tergantung pada umur pohon dan daerah geografisnya. Tebal kulit buah berkisar antara 0,8-1 cm, berwarna keunguan dan biasanya mengandung cairan kuning yang rasanya pahit. Buah manggis mengandung 5-7 segmen. Segmen-segmen umumnya berukuran tidak sama dan biasanya mengandung 1-2 biji. Biji-biji besar berbentuk pipih berwarna ungu gelap atau cokelat dengan panjang 2-2,5 cm, lebar 1,5-2,0 cm dan

tebalnya antara 0,7-1,2 cm tertutup oleh serat lunak yang menyebar sampai ke dalam daging buah. Berat biji bervariasi antara 0,1-2,2 g (Shabella, 2011). Bunga manggis termasuk bunga tunggal yang berkelamin dua. Terletak di ketiak daun, benang sari berwarna kuning dengan putik satu berwarna putih. Akarnya tunggang berwarna putih kecoklatan.

Manggis merupakan salah satu buah unggulan Indonesia yang memiliki peluang ekspor cukup menjanjikan. Permintaan manggis meningkat dari tahun ke tahun seiring dengan kebutuhan konsumen terhadap buah yang mendapat julukan ratu buah (*Queen of Fruits*). Ekspor manggis dari Indonesia mengalami peningkatan seiring dengan kebutuhan buah manggis dunia terutama Hongkong, Singapura, dan Inggris. Di Indonesia manggis disebut dengan berbagai macam nama lokal seperti Manggu (Jawa Barat), Manggis (Jawa), Manggusto (Sulawesi Utara), Mangustan (Maluku) dan Manggi (Sumatera Barat) (Mardiana, 2011).

Berdasarkan hasil skrining fitokimia berbagai fraksi ekstrak kulit buah manggis pada fraksi nonpolar ditemukan antioksidan, saponin, -mangostin, dan triterpenoid (Acharya, 2012). Pada fraksi semipolar ditemukan senyawa antioksidan alkaloid, flavonoid, saponin, tannin dan polifenol. Sedangkan pada fraksi polar ditemukan senyawa antioksidan, flavonoid dan *xanthone*.

Pada fraksi semipolar ditemukan senyawa antioksidan flavonoid. Flavonoid pada pelarut kloroform lebih bersifat polar daripada bersifat semipolar. Flavonoid merupakan golongan terbesar dari senyawa golongan fenol yang bersifat polar sehingga akan banyak terdapat pada ekstrak etanol. Senyawa golongan fenol dari fraksi etanol memiliki aktivitas antioksidan yang lebih

dibandingkan senyawa golongan fenol dari fraksi kloroform (Kiessoun *et al.*, 2010).

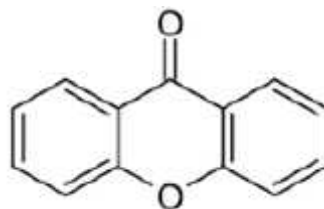
Menurut Weecharansan *et al.*, (2006), kandungan *xanthone* yang terdapat dalam pericarp manggis fraksi polar juga memiliki potensi antioksidan dalam menangkal adanya radikal bebas. Senyawa *xanthone* merupakan substansi kimia alami yang dapat digolongkan dalam senyawa jenis fenol atau *polyphenolic*.

2.4.2 Kandungan pericarp manggis

Kulit buah manggis mengandung senyawa *xanthone* yang meliputi mangostin, mangostenol, mangostinon A, mangostinon B, trapezifolixanton, tovophyllin B, *alfa* dan *beta* mangostin, garcinon E, mangostanol, flavonoid, tanin dan gammamangostin (Hartanto, 2011).

a) *Xanthone*

Senyawa-senyawa pada *xanthone* yang paling banyak dilaporkan memiliki efek farmakologis adalah alfamangostin, gammamangostin, dan garcinon-E. Alfamangostin dan Gammamangostin memiliki efek antioksidan. Alfamangostin dan garcinon-E menghambat proliferasi sel kanker dengan mengaktivasi enzim caspase 3 dan 9 yang memicu apoptosis atau program bunuh diri dari sel kanker (Hasanah, 2012).



Gambar 2.5 Struktur senyawa *xanthone* (Chaverri *et al.*, 2008)

b) Flavonoid

Flavonoid termasuk senyawa fenolik alam yang potensial sebagai antioksidan dan mempunyai bioaktivitas sebagai obat. Flavonoid dalam tubuh manusia berfungsi sebagai antioksidan sehingga sangat baik untuk pencegahan kanker. Pigmen/zat warna yang terdapat dalam tumbuh – tumbuhan seperti zat warna merah, ungu, biru, kuning, dan hijau tergolong senyawa flavonoid. Kandungan flavonoid dapat bermanfaat dalam mekanisme pencegahan kanker. Selain itu, flavonoid juga diduga dapat melarutkan batu ginjal (Markham dan Andersen, 2006).



Gambar 2.6 Struktur senyawa flavonoid (Maslarova, 2005)

c) Tanin

Tanin adalah senyawa lain yang terkandung dalam kulit buah manggis memiliki aktifitas antioksidan. Tanin yang terkandung dalam kulit manggis menyebabkan rasa sepat dan pahit pada buah manggis dan kulitnya. Selain menyebabkan rasa pahit dan sepat, tanin mampu membentuk kompleks kuat dengan protein sehingga menghambat proses absorpsi protein dalam pencernaan, atau bersifat antinutrisi. Oleh karena itu, kadar tanin dalam produk pangan perlu dikurangi sampai kadar aman dan baik untuk pencernaan.

2.4.3 Pemanfaatan tanaman manggis

Ekstrak kulit manggis mempunyai aktivitas melawan sel kanker meliputi payudara, hati, dan leukemia. Selain itu, juga digunakan sebagai anti-histamin, anti-inflamasi, menekan sistem saraf pusat, dan menurunkan tekanan darah. Sedangkan getah kuning dimanfaatkan sebagai bahan baku cat dan insektisida. Rebusan kulit buah manggis mempunyai efek antidiare. Secara empiris, masyarakat Indonesia menggunakan buah manggis untuk mengobati diare, radang amandel, keputihan, disentri, wasir, borok, peluruh dahak, dan sakit gigi. Kulit buah digunakan untuk mengobati sariawan, disentri, nyeri urat, sembelit. Kulit batang digunakan untuk mengatasi nyeri perut. Akar manggis untuk mengatasi haid yang tidak teratur (Hartanto, 2011).

Pemanfaatan kulit buah manggis sebenarnya sudah dilakukan sejak lama. Kulit buah manggis secara tradisional digunakan pada berbagai pengobatan di Negara India, Myanmar Sri langka, dan Thailand. Secara luas, masyarakat Thailand memanfaatkan kulit buah manggis untuk pengobatan penyakit sariawan, disentri, *cystitis*, diare, gonorea, dan eksim. (Mardiana, 2011).

2.4.4 Kajian toksisitas pericarp manggis

Telah disebutkan bahwa pericarp manggis mampu menunjukkan berbagai aktivitas farmakologi. Senyawa-senyawa utama yang dominan menunjukkan aktivitas farmakologi adalah alfa-mangostin, gamma-mangostin dan garsinon-E. Di lain pihak, perlu juga dilakukan penelitian mengenai kemungkinan efek toksik dari penggunaan pericarp manggis tersebut.

Jujun *et al.*, (2006) melakukan uji toksisitas aku maupun subkronis terhadap ekstrak etanol pericarpium manggis yang mengandung senyawa-senyawa aktif pentingnya. Pada percobaan toksistas akut, ekstrak (10-25 %) tersebut tidak menunjukkan efek toksik (kematian dan perubahan fisik ataupun aktivitas) pada tikus. Secara histopatologi, juga tidak ditemukan perubahan yang berarti pada organ-organ vital tikus (hati, jantung, paru-paru, adrenal, ovarium, ginjal, testis). Pada percobaan toksisitas sub-kronis, pemakaian ekstrak etanol pericarpium manggis (dosis 50-1000 mg/kg BB) selama 28 hari juga tidak menunjukkan efek toksik yang berarti, yang meliputi pengamatan gejala efek toksik, perubahan pertumbuhan, bobot organ-organ vital, analisa hematologi, kimia darah maupun histopatologinya.

2.4.5 Antioksidan pada pericarp manggis

Oksidasi adalah jenis reaksi kimia yang melibatkan pengikatan oksigen, pelepasan hidrogen, atau pelepasan elektron. Proses oksidasi adalah peristiwa alami yang terjadi di alam dan dapat terjadi dimana-mana tak terkecuali di dalam tubuh kita. Antioksidan bersifat sangat mudah teroksidasi atau bersifat reduktor kuat dibanding dengan molekul yang lain. Jadi keefektifan antioksidan bergantung dari seberapa kuat daya oksidasinya dibanding dengan molekul yang lain. Semakin mudah teroksidasi maka semakin efektif antioksidan tersebut (Indigomorie, 2009).

Antioksidan didefinisikan sebagai senyawa yang mampu menunda, memperlambat atau menghambat reaksi oksidasi makanan atau obat. Antioksidan

merupakan zat yang mampu melindungi sel melawan kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas (*Reactive Oxygen Species*), seperti singlet oksigen, superoksida, radikal peroksida dan radikal hidroksil serta paparan senyawa 2-ME (Richa, 2009).

Fungsi paling efektif dari antioksidan dalam menghambat terjadinya oksidasi adalah dengan menghentikan reaksi berantai dari radikal-radikal bebas (*primary antioxidant*). Menurut Richa (2009) berkaitan dengan fungsinya senyawa antioksidan dapat diklasifikasikan dalam 5 tipe antioksidan yaitu:

1. *Primary antioxidants*, yaitu senyawa-senyawa fenol yang mampu memutus rantai reaksi pembentukan radikal bebas asam lemak.
2. *Oxygen scavengers*, yaitu senyawa-senyawa yang berperan sebagai pengikat oksigen sehingga tidak mendukung reaksi oksidasi.
3. *Secondary antioxidant*, yaitu senyawa-senyawa yang mempunyai kemampuan untuk berdekomposisi hidroperoksida menjadi produk akhir yang stabil.
4. *Antioxidative Enzyme*, yaitu enzim yang berperan mencegah terbentuknya radikal bebas.
5. *Chelators sequestrants*, yaitu senyawa-senyawa yang mampu mengikat logam seperti besi dan tembaga yang mampu mengkatalisis reaksi oksidasi lemak.

Senyawa antioksidan terkuat, yang terdapat dalam kulit manggis adalah senyawa *xanthone* yang merupakan senyawa organik turunan dari *difenil-pyron*. Senyawa *xanthone* merupakan substansi kimia alami yang dapat digolongkan dalam senyawa jenis fenol atau *polyphenolic*. Karena itulah, senyawa *xanthone*

dapat digolongkan sebagai senyawa polar. Senyawa ini memiliki rumus molekul $C_{13}H_8O_2$, sehingga memiliki massa molar sebesar 196,1910 g/mol. Dalam penamaan menurut IUPAC, senyawa ini diberi nama *9H-xanthen-9-one*.

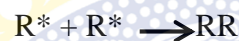
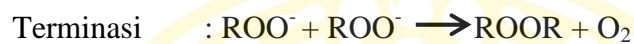
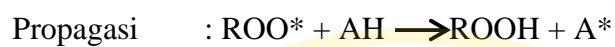
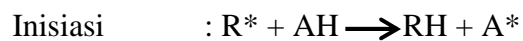
2.4.6 Mekanisme kerja antioksidan

Antioksidan adalah senyawa yang melindungi sel untuk melawan radikal bebas, seperti oksigen singlet, superoksida, radikal peroksil, radikal hidroksil dan *peroxynitrite*. Antioksidan menstabilkan radikal dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas, dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan terjadinya kerusakan sel.

Antioksidan memiliki dua fungsi sesuai mekanisme kerjanya. Fungsi pertama merupakan fungsi utama dari antioksidan yaitu sebagai pemberi atom hidrogen. Antioksidan (AH) yang mempunyai fungsi utama tersebut sering disebut sebagai antioksidan primer. Senyawa ini dapat memberi atom hidrogen secara cepat ke radikal lipida (R^* , ROO^*) atau mengubahnya ke bentuk stabil, sementara turunan radikal antioksidan (A^*) tersebut memiliki keadaan lebih stabil dibanding radikal lipida. Fungsi kedua merupakan fungsi sekunder antioksidan, yaitu memperlambat laju antioksidan dengan berbagai mekanisme di luar mekanisme pemutusan rantai oksidan dengan mengubah radikal lipida ke bentuk lebih stabil (Richa, 2009).

Penambahan antioksidan (AH) primer dengan konsentrasi rendah pada lipida dapat menghalangi reaksi oksidasi pada tahap inisiasi maupun propagasi.

Radikal-radikal antioksidan (A^*) yang terbentuk pada reaksi tersebut stabil dan tidak mempunyai cukup energi untuk dapat bereaksi dengan molekul lipida lain membentuk radikal lipida baru. Radikal-radikal antioksidan dapat saling membentuk produk non radikal (Richa, 2009). Reaksi penghambatan antioksidan primer terhadap radikal lipid adalah sebagai berikut :



2.5 Fraksinasi dan Sifat Pelarut

2.5.1 Fraksinasi

Di alam senyawa kimia umumnya terdapat dalam bentuk campuran, oleh sebab itu diperlukan pemisahan. Fraksinasi adalah suatu proses pemisahan senyawa – senyawa berdasarkan tingkat kepolaran. Jumlah dan senyawa yang dapat dipisahkan menjadi fraksi berbeda-beda tergantung pada jenis tumbuhan. Pemisahan dilakukan dengan tehnik yang bermacam macam seperti kromatografi (KKt, KLT, KGC dan KCKT) dan ekstraksi cair-cair, terkadang digunakan kombinasi keduanya, seringkali dilakukan secara berulang-ulang agar didapat fraksi zat yang lebih banyak. Metode fraksinasi :

1. Ekstraksi Cair-cair

Ekstraksi cair-cair adalah metode pemisahan dengan menggunakan dua cairan pelarut yang tidak saling bercampur, sehingga senyawa tertentu terpisahkan menurut kesesuaian sifat dengan cairan pelarut (prinsip *solve dissolve like*).

2. Kromatografi

Kromatografi adalah teknik pemisahan zat dari campuran berdasarkan perbedaan migrasi komponen-komponen tersebut dari fase diam oleh fase gerak. Pemisahan ini dilakukan berdasarkan sifat fisika-kimia umum dari molekul.

2.5.2 Sifat pelarut

Hal-hal yang perlu diperhatikan dalam pemilihan pelarut diantaranya adalah selektivitas, toksisitas, kepolaran, kemudahan untuk diuapkan, dan harga pelarut (Akbar, 2010). Senyawa organik yang memiliki afinitas berbeda terhadap sifat polaritas dari suatu cairan pengekstrak sehingga diperlukan macam pelarut yang berbeda tingkat polaritasnya. Pelarut organik berdasarkan konstanta dielektrikunya dapat dibedakan menjadi dua yaitu polar dan nonpolar. Toksisitas pelarut yang digunakan merupakan hal yang penting untuk dipertimbangkan dalam ekstraksi antioksidan, karena zat antioksidan akan digunakan pada produk pangan fungsional sehingga keamanannya harus sangat diperhatikan. Beberapa senyawa kimia yang dapat diekstrak oleh pelarut organik berdasarkan tingkat kepolaran pelarut tersebut.

Sebagian besar reaksi kimia secara luas dilakukan di dalam larutan. Larutan terdiri dari pelarut (*solvent*) dan zat terlarut (*solute*). Pelarut (*solvent*) pada umumnya adalah zat yang berada pada larutan dalam jumlah yang besar, sedangkan zat lainnya dianggap sebagai zat terlarut (*solute*).

Pelarut memenuhi beberapa fungsi dalam reaksi kimia, dimana pelarut melarutkan reaktan dan reagen agar keduanya bercampur, sehingga hal ini akan

memudahkan penggabungan antara reaktan dan reagen yang seharusnya terjadi agar dapat merubah reaktan menjadi produk. Pelarut juga bertindak sebagai kontrol suhu, salah satunya untuk meningkatkan energi dari tumbukan partikel sehingga partikel-partikel tersebut dapat bereaksi lebih cepat, atau untuk menyerap panas yang dihasilkan selama reaksi eksotermik.

Tabel 2.1 Polaritas dan senyawa kimia yang diekstrak oleh berbagai pelarut organik.

| Polaritas | Pelarut | Senyawa Kimia yang Diekstraksi | | | |
|------------|-----------------------|--------------------------------|------------|-----------|---------------|
| | | Waxes | Lemak | Minyak | Minyak atsiri |
| Non-Polar | Light Petroleum | Waxes | Lemak | Minyak | Minyak atsiri |
| | Heksan | Waxes | Lemak | Minyak | Minyak atsiri |
| | Sikloheksan | Waxes | Lemak | Minyak | Minyak atsiri |
| | Toluene | Alkaloid | Lemak | Minyak | Minyak atsiri |
| | Kloroform | Alkaloid | Aglikon | | Minyak atsiri |
| Semi-polar | Diklorometan | Alkaloid | Aglikon | | Minyak atsiri |
| | Dietil Eter | Alkaloid | Aglikon | | |
| | Etil Asetat | Alkaloid | Aglikon | Glikosida | |
| | Aseton | Alkaloid | Aglikon | Glikosida | |
| | Etanol | | | Glikosida | |
| Polar | Metanol | Gula | Asam Amino | Glikosida | |
| | Air | Gula | Asam Amino | Glikosida | |
| | <i>Aqueous water</i> | Gula | Asam Amino | | Basa |
| | <i>Aqueous alkali</i> | Gula | Asam Amino | | Asam |

Pada umumnya pelarut yang baik mempunyai kriteria sebagai berikut :

1. Pelarut harus tidak reaktif (inert) terhadap kondisi reaksi.
2. Pelarut harus dapat melarutkan reaktan dan reagen.
3. Pelarut harus memiliki titik didih yang tepat.
4. Pelarut harus mudah dihilangkan pada saat akhir dari reaksi.

Kriteria kedua adalah dengan menggunakan prinsip *like dissolves like*, dimana reaktan yang nonpolar akan larut dalam pelarut nonpolar sedangkan reaktan yang polar akan larut pada pelarut polar. Dalam hal ini juga terdapat tiga ukuran yang dapat menunjukkan kepolaran dari suatu pelarut yaitu :

- a. momen dipol
- b. konstanta dielektrik
- c. kelarutannya dengan air

Molekul dari pelarut dengan momen dipol yang besar dan konstanta dielektrik yang tinggi termasuk polar. Sedangkan molekul dari pelarut yang memiliki momen dipol yang kecil dan konstanta dielektrik rendah diklasifikasikan sebagai nonpolar. Sedangkan secara operasional, pelarut yang larut dengan air termasuk polar, sedangkan pelarut yang tidak larut dalam air termasuk nonpolar.

Berdasarkan kepolaran pelarut, maka para ahli kimia mengklasifikasikan pelarut ke dalam tiga kategori yaitu :

- a. Pelarut Protik Polar

Protik menunjukkan atom hidrogen yang menyerang atom elektronegatif yang dalam hal ini adalah oksigen. Dengan kata lain pelarut protik polar adalah senyawa yang memiliki rumus umum ROH. Contoh dari pelarut protik polar ini adalah air H₂O, metanol CH₃OH, dan asam asetat (CH₃COOH).

- b. Pelarut Aprotik Dipolar

Aprotik menunjukkan molekul yang tidak mengandung ikatan O-H. Pelarut dalam kategori ini, semuanya memiliki ikatan yang memiliki ikatan dipol besar. Biasanya ikatannya merupakan ikatan ganda antara karbon dengan oksigen

atau nitrogen. Contoh dari pelarut yang termasuk kategori ini adalah aseton $[(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{O}]$ dan etil asetat $(\text{CH}_3\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)$.

c. Pelarut Nonpolar

Pelarut nonpolar merupakan senyawa yang memiliki konstanta dielektrik yang rendah dan tidak larut dalam air. Contoh pelarut dari kategori ini adalah benzena (C_6H_6) , karbon tetraklorida (CCl_4) dan dietil eter $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3)$.

