



Pengaruh Mikrosfer Kitosan Minyak Kelapa Sawit pada *Mus m usculus* dengan Nekrosis Tubular Akut

Maria Catur Natalia, Ema Pristi Yunita*, Efta Triastui

Jurusan Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

INFO ARTIKEL

Sejarah artikel:

Penerimaan naskah: 31
Maret 2017

Penerimaan naskah
revisi: 19 September
2017 Disetujui untuk
dipublikasikan 29
September 2017

Kata kunci :

Malondialdehida,
Mikrosfer, Minyak
Kelapa Sawit

ABSTRAK

Nekrosis Tubular Akut merupakan sindrom Gagal Ginjal Akut intrinsik karena kondisi iskemia atau paparan agen nefrotoksik. Hal tersebut menyebabkan banyak sel tubulus mengalami kematian dan menurunkan fungsi tubulus sehingga berakibat Gagal Ginjal Akut. Proses peroksidasi lipid dapat menyebabkan Nekrosis Tubular Akut dan dihasilkan radikal bebas malondialdehida yang dapat merusak fungsi sel. Minyak kelapa sawit dengan kandungan senyawa antioksidan yaitu vitamin E mampu memperbaiki kondisi Nekrosis Tubular Akut dengan menghambat proses peroksidasi lipid sehingga kadar malondialdehida menurun. Minyak kelapa sawit dengan pembawa kitosan dalam bentuk mikrosfer memungkinkan peningkatan bioavailabilitas minyak kelapa sawit sehingga dapat menembus ginjal. Uji separasi menggunakan eluen n-heksan : isopropanol (98 : 2) untuk senyawa-senyawa dalam minyak kelapa sawit memiliki nilai rerata Rf sebesar $0,312 \pm 0,014$. Studi eksperimental *post-test only controlled group design* dilakukan pada 24 *Mus musculus* yang terbagi dalam 6 kelompok. Kelompok-kelompok tersebut meliputi kontrol positif/memperoleh gentamisin dosis 0,14 mg/gBB (KP), kontrol negatif/tanpa perlakuan (KN), kelompok mikrosfer kitosan minyak kelapa sawit dosis 0,072 mg/gBB (P1) dan dosis 0,107 mg/gBB (P2), serta kelompok minyak kelapa sawit dosis 0,14 mg/gBB (P3) dan dosis 0,21 mg/gBB (P4). Setiap terapi diberikan selama 14 hari. Variabel yang diukur adalah kadar malondialdehida menggunakan metode spektrofotometri (Na-TBA). Hasil menunjukkan kadar malondialdehida dari yang tertinggi sampai yang terendah berturut-turut adalah KP, P1, P2, P3, P4, dan KN. Kelompok KN, P2, P3, dan P4 memiliki perbedaan yang signifikan dengan KP ($p < 0,001$) sementara kelompok KP, P1, P2, P3, dan P4 memiliki perbedaan yang signifikan dengan KN ($p < 0,001$). Penelitian ini menunjukkan bahwa mikrosfer kitosan minyak kelapa sawit dapat menurunkan kadar malondialdehida *Mus musculus* yang mengalami Nekrosis Tubular Akut pada dosis mikrosfer minyak kelapa sawit sebesar 0,107 mg/gBB.

Effect of Palm Oil Chitosan Microspheres at *Mus musculus* with Acute Tubular Necrosis

Keywords:

Malondialdehyde,
Microsphere, Crude
Palm Oil

ABSTRACT

Acute Tubular Necrosis is a syndrome of intrinsic Acute Renal Failure because of the conditions of ischemia or exposure to nephrotoxic agents. This causes a lot of tubular cell death and lower tubular function resulting in Acute Renal Failure. The process could cause Acute Tubular Necrosis lipid peroxidation and generated free radicals malondialdehyde, which can damage cell function. Palm oil contains antioxidant compounds i.e. vitamin E, capable of improving the condition of the Acute Tubular Necrosis to inhibit lipid peroxidation process so that the levels of malondialdehyde decreased. Palm oil combined with chitosan carrier in the form of microspheres allow bioavailability enhancement so that it could penetrate the kidneys. The separation test using TLC and n-hexane : isopropanol eluent system (98 : 2) for compounds in crude palm oil produced Rf mean value of 0.312 ± 0.014 . This Study was experimental post-test only controlled group design, conducted at 24 *Mus musculus* that were divided into 6 groups, which are: The positive control group/gentamicin 0.14 mg/gBB (KP); negative control/without treatment (KN); a group of microspheres chitosan palm oil with dose of 0.072 mg/gBW (P1) and a dose of 0.107 mg/gBW (P2); palm oil group dose of 0.14 mg/gBW (P3) and a dose of 0.21 mg/gBW (P4). Each treatment was given for 14 days. The measured variables was malondialdehyde using spectrophotometric method (Na-TBA). The results showed that malondialdehyde levels from the highest to the lowest were KP, P1, P2, P3, P4, and KN. Group of KN, P2, P3, and P4 had significant differences compared to KP ($p < 0.001$) while groups of KP, P1, P2, P3, and P4 had significant differences compared to KN ($p < 0.001$). This study showed that the chitosan microspheres palm oil could reduce levels of malondialdehyde in Acute Tubular Necrosis *Mus musculus* with dose of 0.107 mg/gBW.

* Corresponding author Ema Pristi Yunita, Jurusan Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Jalan Veteran, Malang 65145, Jawa Timur, Indonesia Tel.: +62857-3071-2002; Fax: +62341-564755. E-mail: emapristi@ub.ac.id

1. Pendahuluan

NTA (Nekrosis Tubular Akut) merupakan sindrom GGA (Gagal Ginjal Akut) intrinsik yang dikarenakan oleh kondisi iskemia atau paparan zat toksik sehingga banyak sel tubulus yang mengalami nekrosis.¹ Pada kondisi iskemia, terjadi deplesi ATP secara cepat yang berakibat bocornya dinding tubulus karena lepasnya adhesi epitel pada tubulus. Selain itu, tubulus juga mengalami buntuan akibat pembentukan gel polimerik yang disebabkan oleh peningkatan protein Tamm-Horsfal yang tidak direabsorpsi oleh tubulus ginjal. Deplesi ATP juga dapat menyebabkan pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang dapat merusak sel epitel tubulus.²

Salah satu penyebab dari NTA adalah adanya peningkatan ROS.^{2,3} ROS dapat bereaksi dengan asam lemak tak jenuh pada membran lipid dan menginduksi peroksidasi lipid yang dapat mengubah permeabilitas dan integritas dinding sel tubulus proksimal.⁴ Hasil peroksidasi lipid berupa malondialdehida (MDA) dapat bereaksi dengan protein, lipoprotein, RNA, dan DNA sehingga mengganggu fungsi biomolekuler dan menyebabkan kerusakan sel tubulus proksimal yang dilihat dari adanya nekrosis.⁵ Kadar MDA dapat menjadi indikator yang penting untuk mengetahui tingkat peroksidasi lipid dan kondisi stres oksidatif.⁶

Bahan alam yang berpotensi untuk menurunkan peroksidasi lipid sehingga dapat memperbaiki kondisi NTA, salah satunya adalah minyak kelapa sawit. Minyak kelapa sawit mengandung beberapa senyawa fitokimia fenolik yaitu karoten, tokoferol, tokotrienol, skualen, *sterol*, dan koenzim Q.⁷ Senyawa fenolik ini memiliki fungsi sebagai antioksidan, utamanya senyawa vitamin E yang meliputi tokoferol, tokomonoenol, dan tokotrienol.⁸

Mikrosfer kitosan merupakan sistem pembawa obat dengan polimer kitosan dalam bentuk mikrosfer yang dapat membawa obat menuju ke ginjal. Kitosan bersifat *biocompatible* dan *biodegradable*.⁹ Mikrosfer kitosan dalam bentuk LMWC (*Low Molecular Weight Chitosan*) dengan ukuran yang spesifik akan diambil oleh sel tubulus ginjal dan akan melepaskan obat dengan mekanisme enzimatik atau hidrolisis.¹⁰ Melalui sistem pembawa ini maka bisa menghantarkan minyak kelapa sawit menuju ke ginjal karena sistem pembawa tersebut mampu membuat ukuran minyak kelapa sawit menjadi lebih kecil sehingga lebih mudah menembus sel tubulus ginjal. Dengan demikian dapat diperoleh efek yang diharapkan yaitu penurunan kerusakan sel ginjal pada kondisi NTA melalui penurunan proses peroksidasi lipid dan MDA serta mampu menurunkan progresivitas NTA dan mencegah kondisi GGA.

2. Metode

Populasi dan Sampel

Penelitian ini menggunakan 24 *Mus musculus* jantan dengan usia 2-3 bulan dan berat badan 20-30 gram yang dibagi menjadi 6 kelompok yaitu kelompok kontrol

negatif (KN) yang tidak diinduksi NTA dan tidak diterapi, kontrol positif (KP) yang diinduksi NTA namun tidak diterapi, dan 4 kelompok perlakuan (P1, P2, P3, P4) yang diinduksi NTA dan diterapi dengan mikrosfer kitosan minyak kelapa sawit dan minyak kelapa sawit tanpa pembawa selama 14 hari.

Pembuatan LMWC

Dilakukan dengan metode hidrolisis menggunakan HCl 1 M sebanyak 1 L untuk 10 gram kitosan yang diperoleh dari Phydumedia selama 2 jam dengan suhu 70°C dan kecepatan 700 rpm. Selanjutnya dilakukan netralisasi sampai pH 6,5-7,0 dengan NaOH 1 N dan disaring. Tahap berikutnya yaitu dikeringkan dalam oven dengan suhu 40°C selama 24 jam.^{11,12}

Uji LMWC

LMWC diuji menggunakan metode Viskometer Ostwald. Larutan kitosan disiapkan dengan konsentrasi 0,00; 0,02; 0,04; 0,06; dan 0,08 %b/v dalam larutan asam asetat 1% sebanyak 100 ml. Kemudian larutan dimasukkan ke dalam alat viskometer Ostwald dan dilakukan perhitungan berat molekul melalui persamaan sebagai berikut¹¹:

$$n_{sp} = (t-t_0)/t_0$$

Keterangan:

n_{sp} = viskositas spesifik (detik)

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

t_0 = waktu yang diperlukan untuk mengalirnya larutan solven (detik)

Data yang diperoleh selanjutnya dibuat grafik n_{sp}/C terhadap C dan menentukan viskositas intrinsik untuk perhitungan berat molekul. Viskositas intrinsik merupakan titik pada grafik yang menunjukkan nilai C = 0. Berat molekul ditentukan dengan persamaan Mark-Houwink yaitu^{11,13}:

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

Keterangan:

$[\eta]$ = viskositas intrinsik

k = konstanta pelarut ($3,5 \times 10^{-4}$)

α = konstanta (1,02)

M = berat molekul

Uji Separasi Senyawa-Senyawa dalam Minyak Kelapa Sawit

Uji fitokimia dilakukan dengan uji KLT menggunakan eluen n-heksana : isopropanol (98 : 2) sebanyak 20 ml dan diamati dalam UV-Vis dengan panjang gelombang 254 nm, ditandai noda yang terlihat dan dilakukan perhitungan Rf. Selanjutnya dilakukan perbandingan nilai Rf dengan literatur dimana senyawa tokols memiliki Rf sebesar 0,34.¹⁴

Formulasi Mikrosfer Kitosan Minyak Kelapa Sawit

LMWC ditimbang sebanyak 1,5 gram dan dilarutkan dalam 50 ml asam laktat 2,4%. Kemudian larutan diaduk dengan *magnetic stirrer* selama 1 jam dengan kecepatan 700 rpm. Selanjutnya ditambahkan minyak kelapa sawit sebanyak 10 ml dan diaduk kembali selama 15

menit. Kemudian disiapkan 120 ml larutan STPP 5% b/v dalam *beaker glass* dan ditambahkan campuran kitosan-minyak kelapa sawit menggunakan spuit jarum (ukuran 18G) tetes demi tetes dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 700 rpm selama 15 menit. Selanjutnya ditambahkan formaldehida 1,3% sampai terbentuk partikel (± 3 ml) dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* kecepatan 700 rpm selama 15 menit. Setelah itu, dilakukan penyaringan menggunakan pompa vakum dan kertas Whatmann No. 1 dan dibilas menggunakan 10 ml aseton. Hasil penyaringan dikeringkan dalam cawan petri selama 5 hari pada suhu ruang.¹⁵

Evaluasi Mikrosfer Menggunakan SEM (*Scanning Electron Microscopy*)

Sampel ditempatkan dalam *aluminium holder* menggunakan isolasi karbon yang memiliki dua sisi yang lengket. Selanjutnya sampel dikeringkan dalam oven dengan suhu 60°C selama minimal 3 jam. Kemudian sampel ditempatkan dalam lubang tempat sampel di SEM dan dinyalakan SEM untuk diamati.⁹

Evaluasi Toksisitas Formaldehid dan Aseton

Pada penelitian ini digunakan aseton dan formaldehida sebagai bagian dari formula mikrosfer kitosan minyak kelapa sawit. Aseton digunakan pada proses pembilasan sedangkan formaldehida digunakan sebagai agen pengental. Aseton dan formaldehida pada dosis toksik dapat mengakibatkan kerusakan organ sehingga perlu dilakukan evaluasi toksisitas. Evaluasi residu formaldehida dan aseton dilakukan dengan membandingkan dosis yang bisa ditoleransi oleh mencit per hari dengan kandungan formaldehida dan aseton dalam sediaan yang diberikan ke mencit per hari. Selain itu, juga dilakukan pemantauan gejala klinis terjadinya toksisitas formaldehida yang berupa iritasi lokal pada jaringan rongga mulut *Mus musculus* dan aseton yang berupa iritasi mata dan lakrimasi pada mata.¹⁶ Kondisi fisik lain yang juga perlu diamati adalah kemungkinan pembengkakan organ yang mengakibatkan rasa nyeri dan hewan coba menjadi tidak aktif bergerak.¹⁷

Induksi NTA

Induksi NTA dilakukan dengan menggunakan gentamisin i.p 0,14 mg/gBB selama 7 hari pada sampel karena penggunaan gentamisin 100 mg/kgBB selama 7 hari mampu menginduksi kondisi NTA yang ditandai dengan sel tubulus proksimal yang nekrosis dan hilangnya lumen tubulus proksimal.

Uji Keberhasilan Induksi (Histopatologi)

Dilakukan pembedahan pada mencit yang telah diinduksi dengan gentamisin 0,14 mg/gBB selama 7 hari. Selanjutnya dilakukan preparasi jaringan dalam bentuk *slide* dengan pengecatan HE (Hematoksilin dan Eosin) kemudian diamati menggunakan mikroskop BX dengan perbesaran 400 kali.

Uji Efektivitas Minyak Kelapa Sawit

Sampel kelompok P1 diberi mikrosfer kitosan minyak kelapa sawit dengan dosis 0,072 mg/gBB, P2 diberi

mikrosfer kitosan minyak kelapa sawit dengan dosis 0,107 mg/gBB, P3 diberi minyak kelapa sawit dengan dosis 0,14 mg/gBB, dan P4 diberi minyak kelapa sawit dengan dosis 0,21 mg/gBB selama 14 hari. Kemudian dilakukan pembedahan dan pengambilan sampel berupa organ ginjal.

Pengukuran MDA

Ginjal dari masing-masing sampel ditimbang dengan berat rata-rata 100 mg. Kemudian ginjal digerus di mortir sampai halus dan diberi dapar fosfat sebanyak 1 ml dengan pH 7,4. Selanjutnya hasil dimasukkan ke tabung mikro dan ditambah dengan 200 μ l TCA, 200 μ l HCl 1 N, 200 μ l Na-Thio, dan terakhir ditambahkan akuades secukupnya untuk mencegah sampel mengering ketika proses pemanasan. Selanjutnya, sampel dipanaskan dalam penangas air dengan suhu 105°C selama 30 menit dan selanjutnya dilakukan sentrifugasi selama 10 menit, 3500 rpm dalam suhu ruang. Kemudian diambil supernatannya dan dilakukan pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis (532 nm).¹⁸

Analisis Data

Uji hipotesis dilakukan dengan tingkat signifikansi 0,05. Metode analisis dimulai dengan uji normalitas dan homogenitas yang selanjutnya dilakukan uji perbandingan dengan *one-way ANOVA*.

3. Hasil

Pembuatan dan Uji LMWC

Hasil uji berat molekul menggunakan viskometer Ostwald dari tiga *batch* formulasi rata-rata adalah $34,837 \pm 3,802$ kDa. Hasil ini menunjukkan bahwa LMWC memenuhi kriteria LMWC yang dapat menghantarkan obat ke ginjal secara optimal karena memiliki BM < 70 kDa.¹⁰

Uji Separasi Senyawa-Senyawa dalam Minyak Kelapa Sawit

Uji separasi senyawa-senyawa dalam minyak kelapa sawit didapatkan memiliki nilai rata-rata Rf sebesar $0,312 \pm 0,014$. Hasil ini mendekati nilai Rf senyawa tolak berdasarkan Chandrasekaram (2009) yaitu sebesar 0,34.¹⁴

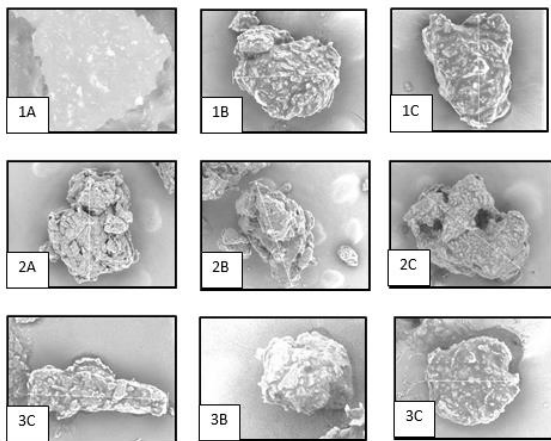
Formulasi dan Evaluasi Bentuk-Ukuran Mikrosfer Kitosan Minyak Kelapa Sawit

Berdasarkan formulasi yang dilakukan sebanyak 3 kali maka dihasilkan 3 *batch* formula dengan bobot rata-rata sebesar $4,860 \pm 0,1432$ g. Pengukuran diameter mikrosfer dengan SEM pada *batch* formula mikrosfer yang pertama yaitu 263 μ m dan 289 μ m; *batch* formula mikrosfer yang kedua yaitu 687 μ m, 514 μ m, dan 486 μ m; serta *batch* formula mikrosfer yang ketiga yaitu 156 μ m, 215 μ m, dan 217 μ m. Hasil evaluasi bentuk yang didapatkan dapat dilihat pada Gambar 1.

Evaluasi Toksisitas Formaldehida dan Aseton

Dari penelitian ini didapatkan bahwa kadar maksimal dari formaldehida dan aseton untuk 1 mencit per hari sebesar 0,0012 mg/gBB dan 0,7043 mg/gBB. Hasil ini menunjukkan kadar yang masih aman karena maksimal dosis yang dapat ditoleransi per hari untuk mencit adalah

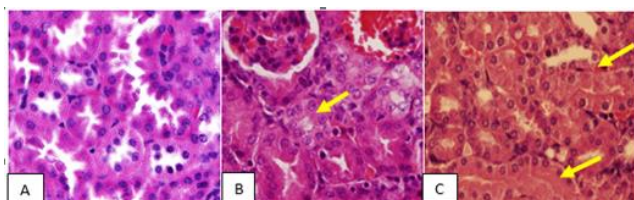
0,035 mg/gBB untuk formaldehida dan 2,3 mg/gBB untuk aseton.^{19,20} Hasil pemantauan gejala klinik menunjukkan bahwa mencit tidak mengalami gejala toksisitas formaldehida dan aseton.



Gambar 1. Bentuk Mikrosfer Kitosan Hasil SEM: 1A (200x), 1B (400x), dan 1C (400x) merupakan mikrosfer hasil *batch* pertama; 2A (200x), 2B (150x), dan 2C (250x) merupakan mikrosfer hasil *batch* kedua; dan 3A (600x), 3B (500x), dan 3C (400x) merupakan mikrosfer hasil *batch* ketiga.

Uji Keberhasilan Induksi NTA Menggunakan Gentamisin 0,14 mg/gBB

Histologi pada mencit yang telah diinduksi selama 7 hari menunjukkan bahwa terdapat celah antar inti sel pada tubulus proksimal yang menunjukkan sel diantaranya mengalami nekrosis (Gambar 2). Hal tersebut ditandai oleh hilangnya inti sel. Hilangnya inti sel tersebut menunjukkan tanda dari NTA yang merupakan tanda awal GGA. Selain sel yang mengalami nekrosis, tanda lain timbulnya NTA juga dapat dilihat dari hilangnya lumen pada tubulus. Dapat disimpulkan bahwa induksi selama 7 hari berhasil membuat mencit mengalami NTA.⁵



Gambar 2. Histologi Ginjal Evaluasi Induksi: (A) mencit normal memiliki lumen tubulus yang jelas dan inti sel yang masih lengkap; (B) mencit yang diinduksi selama 5 hari menunjukkan lumen tubulus yang mulai menghilang namun belum mengalami nekrosis yang ditunjukkan oleh panah kuning; (C) mencit induksi selama 7 hari menunjukkan lumen tubulus yang menghilang dan sel yang tidak berinti atau mengalami nekrosis yang ditunjukkan oleh panah kuning.

Uji Efektivitas Mikrosfer Kitosan Minyak Kelapa Sawit (P1 dan P2) dan Minyak Kelapa Sawit (P3 dan P4) Berdasarkan Pengukuran MDA

Hasil analisis uji *one-way* ANOVA dari pengukuran kadar MDA dapat dilihat pada Tabel 1 dan selanjutnya dilanjutkan dengan *post-hoc* LSD yang dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 1. Hasil Analisis *one-way* ANOVA

	n	Rerata Kadar MDA ± s.b (ng/100 mg)	p	
Kadar MDA	KN	4	0,137 ± 0,015	< 0,001*
	KP	4	0,518 ± 0,094	
	P1	4	0,431 ± 0,032	
	P2	4	0,345 ± 0,012	
	P3	4	0,293 ± 0,029	
	P4	4	0,239 ± 0,035	

Keterangan: *signifikan secara statistik

Tabel 2. Hasil Analisis *post-hoc* LSD

Perbedaan Rerata	IK 95%		p	
	Minimum	Maksimum		
KN vs KP	-0,574	-0,658	-0,491	< 0,001*
KN vs P1	-0,498	-0,582	-0,415	< 0,001*
KN vs P2	-0,404	-0,487	-0,320	< 0,001*
KN vs P3	-0,331	-0,415	-0,248	< 0,001*
KN vs P4	-0,241	-0,325	-0,158	< 0,001*
KP vs P2	0,171	0,087	0,254	< 0,001*
KP vs P3	0,243	0,160	0,326	< 0,001*
KP vs P4	0,333	0,250	0,417	< 0,001*
P1 vs P2	0,095	0,011	0,178	0,028*
P1 vs P3	0,167	0,084	0,250	0,001*
P1 vs P4	0,257	0,174	0,341	< 0,001*
P2 vs P4	0,162	0,079	0,246	0,001*
P3 vs P4	0,090	0,007	0,174	0,035*

Keterangan: *signifikan secara statistik

Hasil *one-way* ANOVA menunjukkan bahwa KN dengan KP, P1, P2, P3, dan P4 memiliki perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Perbandingan KP dengan KN, P2, P3, dan P4 berbeda secara signifikan ($p < 0,05$). Untuk kelompok P1 memiliki perbedaan rata-rata kadar MDA yang signifikan dengan kelompok KN, P2, P3, dan P4 ($p < 0,05$). Kelompok P2 memiliki perbedaan rata-rata MDA yang signifikan dengan kelompok KN, KP, P1, dan P4 ($p < 0,05$). Untuk kelompok P3 memiliki perbedaan kadar rata-rata MDA dengan kelompok KN, KP, P1, P4 yang signifikan ($p < 0,05$), sedangkan untuk kelompok P4 memiliki perbedaan yang signifikan dengan KN, KP, P1, P2, dan P3 ($p > 0,05$).²¹

4. Pembahasan

Salah satu karakterisasi mikrosfer adalah dengan menghitung persen penjeratan zat aktif yaitu membandingkan antara jumlah bahan aktif dalam mikrosfer dengan jumlah teoritis bahan aktif dalam mikrosfer kemudian dikalikan 100%.²³ Semakin mendekati nilai 100% maka persen penjeratan semakin baik. Tujuan mengetahui persen penjeratan adalah untuk optimasi metode sehingga bahan yang digunakan tidak banyak terbuang. Namun demikian, pada penelitian ini tidak dilakukan uji persen penjeratan minyak kelapa sawit dalam bentuk sediaan mikrosfer kitosan sehingga tidak didapatkan kandungan minyak kelapa sawit secara akurat per satu gram mikrosfer kitosan minyak kelapa sawit. Oleh karenanya, hal tersebut menjadi keterbatasan dalam penelitian ini.

Berdasarkan hasil pengukuran kadar rata-rata

MDA tiap kelompok dapat dilihat bahwa KN memiliki kadar MDA paling kecil. Hal ini menunjukkan bahwa pada kondisi normal tetap terjadi peroksidasi lipid akibat adanya ROS endogen. Pada metabolisme seluler secara normal dihasilkan produk samping berupa ROS endogen.²⁴ ROS akan berikatan dengan lipid membran sel dan menghasilkan peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid akan menghasilkan MDA. Dengan demikian maka walaupun dalam keadaan normal pada ginjal mencit masih menghasilkan MDA, namun dalam kadar $0,137 \pm 0,015$ ng/100 mg ini MDA tidak mengakibatkan NTA. Kelompok KP memiliki kadar MDA paling tinggi yaitu $0,518 \pm 0,094$ ng/100 mg. Hasil ini dikarenakan KP merupakan kelompok yang diinduksi dengan gentamisin yang memiliki efek meningkatkan ROS karena mengganggu fungsi dari mitokondria sehingga kadar MDA KP lebih tinggi dibandingkan KN, sedangkan dengan kelompok perlakuan kadar KP masih lebih tinggi hal ini dikarenakan kelompok KP tidak diberi agen yang dapat menghentikan proses peroksidasi lipid.²⁵ Pada proses peroksidasi lipid tidak ada agen yang menghentikan proses propagasi dengan memberikan atom hidrogen pada radikal lipid sehingga proses ini terjadi terus menerus dan menghasilkan produk peroksidasi lipid yaitu MDA yang tinggi.²⁶

Kelompok P1 memiliki kadar MDA yang lebih rendah jika dibandingkan dengan KP. Namun jika dibandingkan dengan KN kadar MDA ini masih lebih tinggi. P1 memiliki perbedaan yang signifikan dengan KN ($p < 0,001$) dan tidak memiliki perbedaan yang signifikan dengan KP ($p > 0,05$). Kemungkinan dengan dosis mikrosfer kitosan $0,072$ mg/gBB kandungan senyawa tokols tidak bisa menghentikan proses peroksidasi lipid secara signifikan dikarenakan jumlah senyawa yang mendonorkan atom hidrogen belum adekuat untuk mengatasi peroksidasi lipid. Pada penelitian sebelumnya disebutkan bahwa minyak kelapa sawit yang memberikan efek terhadap proteksi ginjal adalah dengan dosis 100 mg/kgBB tikus yang setara dengan $0,14$ mg/gBB mencit.²⁷ Namun belum ada penelitian sebelumnya yang meneliti efek pemberian minyak kelapa sawit dalam bentuk mikrosfer kitosan dalam menurunkan kadar MDA ginjal.

Kelompok P2 memiliki kadar MDA yang lebih rendah dari KP dan P1 namun lebih tinggi dari KN. P2 memiliki perbedaan yang signifikan dengan KP menunjukkan bahwa dengan pembawa LMWC dalam bentuk mikrosfer kitosan dapat menghantarkan minyak kelapa sawit ke ginjal walaupun hanya dengan kandungan yang kecil sehingga dapat menghambat proses peroksidasi lipid dan memiliki efek penurunan MDA. Kelompok P2 bisa memberikan efek terhadap jumlah MDA yang lebih rendah secara signifikan jika dibandingkan dengan KP dikarenakan minyak kelapa sawit yang terkandung di dalamnya cukup dalam menghambat peroksidasi lipid. Minyak kelapa sawit banyak mengandung senyawa antioksidan yang poten diantaranya yaitu senyawa tokols seperti tokoferol, tokotrienol, dan toko monoenol.⁸ Senyawa ini memiliki gugus fenolik yang mengandung OH. Senyawa ini menghambat proses propagasi dengan memberikan atom

hidrogen pada gugus fenoliknya pada radikal peroksil dan mengubahnya menjadi senyawa hidroperoksida yang stabil. Radikal tokoferol yang terbentuk akibat mendonorkan atom hidrogennya bersifat stabil dan tidak melanjutkan propagasi. Senyawa ini justru dibuang dari siklus dengan reaksi bersama radikal peroksil lainnya dan membentuk senyawa inaktif dan tidak radikal.²⁸ Dengan demikian maka peroksidasi lipid lebih ditekan dan menurun sehingga kadar MDA juga menurun.

Pada penelitian sebelumnya disebutkan bahwa minyak kelapa sawit yang memberikan efek terhadap proteksi ginjal dimulai dengan dosis 100 mg/kgBB tikus yang setara dengan $0,14$ mg/gBB mencit.²⁷ Namun berdasarkan hasil penelitian, kelompok P2 dengan dosis $0,107$ mg/gBB telah memiliki efek yang baik ke ginjal dengan menghasilkan kadar MDA yang lebih kecil secara signifikan dibandingkan KP. Kemungkinan hal ini dikarenakan terjadi peningkatan akumulasi minyak kelapa sawit di ginjal karena pembawa LMWC yang kurang dari 70 kDa. LMWC dengan berat molekul kurang dari 70 kDa akan mudah berpindah dari sirkulasi menuju ke lumen tubulus melalui filtrasi glomerulus. Selain itu metabolisme oleh hati dan limfa dapat dikurangi dikarenakan LMWC memiliki kemampuan menghindari penangkapan atau mengurangi pengambilan oleh organ hepar dan limfa.¹⁰ LMWC dapat menghindari hepar untuk metabolisme dikarenakan kitosan ini memiliki permukaan yang bersifat polar sehingga kitosan diekskresi ke ginjal secara langsung.²⁹ Kemudian LMWC juga dapat meningkatkan akumulasi minyak kelapa sawit di ginjal dikarenakan ada reseptor megalin di tubulus ginjal yang dapat menyerap pembawa kitosan ini.¹⁰ Melalui tiga mekanisme tersebut minyak kelapa sawit yang bersifat non polar dapat dibawa ke ginjal oleh LMWC.

Selain itu bentuk sediaan mikrosfer juga meningkatkan akumulasi minyak kelapa sawit di ginjal sehingga diharapkan akan mampu meningkatkan distribusi mikrosfer di korteks ginjal. Peningkatan distribusi mikrosfer ini dikarenakan ukurannya yang kecil sehingga partikel mudah memasuki jaringan yang terjadi inflamasi khususnya bagian tubulus pada kondisi NTA. Mikrosfer kitosan juga memungkinkan penghantaran obat yang bersifat non polar dengan metode pembuatan emulsi *crosslinking* sehingga meningkatkan bioavailabilitas minyak kelapa sawit karena walaupun minyak kelapa sawit bersifat hidrofobik, dengan formulasi menggunakan mikrosfer kitosan dapat membuat minyak kelapa sawit lebih mudah terdistribusi khususnya ke ginjal.⁹

Untuk kelompok P3 kadar MDA berbeda secara signifikan dengan KP dan KN ($p < 0,001$). Kadar MDA kelompok ini lebih kecil dibandingkan dengan KP dan lebih besar jika dibandingkan dengan KN. Namun selisih antara P3 dengan KP lebih besar dibandingkan dengan KN. Dengan demikian penurunan sudah mendekati KN. Hal ini menunjukkan bahwa minyak kelapa sawit dengan dosis $0,14$ mg/gBB memiliki efek terhadap jumlah MDA yang mengakibatkan jumlah MDA lebih sedikit. Hal ini dikarenakan minyak kelapa sawit memiliki senyawa tokols

yang memiliki gugus OH dan bersifat sebagai antioksidan sehingga senyawa ini dapat mendonorkan atom hidrogen untuk menghambat proses peroksidasi lipid sehingga kadar MDA menurun.^{26,27} Minyak kelapa sawit ini memiliki sifat non polar sehingga dimetabolisme oleh hati menjadi senyawa yang lebih polar untuk bisa diekskresi ke ginjal. Namun senyawa ini masih memiliki efek dalam menurunkan MDA di ginjal dikarenakan hasil metabolit dari senyawa ini yaitu senyawa turunan karboksietil-hidroksikroman yang bersifat polar masih memiliki gugus OH.^{30,31}

Untuk kelompok P4 memiliki kadar MDA $0,239 \pm 0,035$ ng/100 mg. Kadar ini memiliki perbedaan yang signifikan dengan KN, KP, dan P3. Namun kadar ini lebih mendekati KN dikarenakan selisih terhadap KN lebih kecil dibandingkan dengan KP. Mekanisme dari P4 yang dapat menghasilkan jumlah kadar MDA yang lebih rendah secara signifikan memiliki mekanisme yang sama dengan P3 yang telah disebutkan sebelumnya. Namun jika dibandingkan dengan P3 nilai MDA P4 lebih kecil. Pada penelitian sebelumnya disebutkan bahwa dosis minyak kelapa sawit terbukti menunjukkan efek yang baik terhadap proteksi ginjal pada dosis 100 mg/kgBB tikus atau setara dengan 0,14 mg/gBB mencit dan pada dosis lebih besar sama dengan 200 mg/kgBB tikus tidak menunjukkan hasil yang bagus.²⁷ Dosis minyak kelapa sawit yang digunakan untuk kelompok P4 adalah 0,21 mg/gBB. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar MDA dengan dosis 0,21 mg/gBB lebih kecil dibandingkan dengan dosis 0,14 mg/gBB. Hasil ini menunjukkan bahwa dengan dosis 0,21 mg/gBB efek terhadap penurunan MDA untuk mencegah kerusakan ginjal masih lebih bagus dibandingkan dengan dosis 0,14 mg/gBB. Hal ini dikarenakan kandungan minyak kelapa sawit lebih banyak sehingga kandungan senyawa yang menghambat peroksidasi lipid juga lebih banyak. Berdasarkan penelitian ini maka dapat disimpulkan bahwa pemberian minyak kelapa sawit dengan pembawa kitosan dalam bentuk mikrosfer (P1 dan P2) serta minyak kelapa sawit tanpa pembawa kitosan dalam bentuk mikrosfer (P3 dan P4) memiliki rerata kadar MDA (lihat Tabel 1) di ginjal lebih kecil dibandingkan kelompok kontrol yang tidak diberikan minyak kelapa sawit baik dengan pembawa maupun tanpa pembawa kitosan dalam bentuk mikrosfer (KP) walaupun jumlah MDA nya masih belum mendekati jumlah normal (KN). Mikrosfer kitosan minyak kelapa sawit memiliki efek penurunan terhadap kadar MDA yang signifikan pada pada dosis 0,107 mg/gBB. Minyak kelapa sawit tanpa pembawa dapat menurunkan kadar MDA pada dosis 0,14 mg/gBB dan efek penurunan MDA pada pemberian minyak kelapa sawit lebih besar pada dosis 0,21 mg/gBB dibandingkan 0,14 mg/gBB.

5. Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kepala Laboratorium Farmasi dan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya (FKUB) yang

telah memberikan ijin penggunaan laboratorium. Penulis juga menyampaikan terima kasih kepada Pranata Laboratorium Pendidikan Farmasi dan Pranata Laboratorium Pendidikan Farmakologi FKUB atas bantuannya selama pelaksanaan penelitian ini.

6. Daftar Pustaka

- Rosen S, Isaac ES. *Acute tubular necrosis is a syndrome of physiologic and pathologic dissociation*. J Am Soc Nephrol. 2008 May; 19(5):871-875.
- Rinawati W, Diana A. *Kidney injury molecul-1 (KIM-1) sebagai penanda baru nekrosis tubular akut*. Majalah Kedokteran Indonesia. 2011; 61(2):81-85.
- Dipiro JT, Talbert RL, Yee GC, Matzke GR, Wells BG, Posey LM *Pharmacotherapy: a pathophysiologic approach*. New York: The McGraw-Hill Companies, Inc.; 2008.
- Barrera G. *Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy*. ISRN Oncology. 2012; (2012):1-21.
- Atlas of Pathology. *Toxic tubular necrosis third edition*. Romania: University Medicine of Pharmcare; 2009.
- Jetawattana S. *Malondialdehyde (MDA) a lipid oxidation product*. [paper]. Iowa: Departement of Radiation Oncology University of Iowa; 2005.
- Saifudin A, Saltanat HR. *Enhancing the removal of phenolic compounds from palm oil mill effluent by enzymatic pre-treatment and microwave-assisted extraction*. Chem Sci Trans. 2014 Jul; 3(3):1083-1093.
- Han M, Yuen M, Ah NM, Cheng HC, Mohamed AY. *Separation of vitamin E (tocopherol, tocotrienol, and tocomonoenol) in palm oil*. Lipids. 2004 Oct; 39(10):1031-1035.
- Mitra A, Baisakhi D. *Chitosan microspheres in novel drug delivery systems*. Indian J. Pharm. Sci. 2011 Jul-Aug; 73(4):355-366.
- Yuan ZX, Jing JL, Xun S, Tao G, Zhi RZ. *Enhanced accumulation of low molecular weight chitosan in kidneys: a study on the influence of n-acetylation of chitosan on the renal targeting*. J Drug Target. 2011 Jul; 19(7):540-551.
- Paramita ID, Dewi RP, Prasetyaningrum A. *Kinetika reaksi hidrolisa LMWCS menggunakan asam klorida*. Jurnal Teknologi Kimia dan Industri. 2012 Nov; 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*. Mar. Drugs. 2015 Mar; 13:1710-1725.
- Ghosh P. *Fundamental of polymer science: molecular weight of polymer*. [paper]. Kolkata: Polymer Study Centre; 2006.

14. Chandrasekaram K. *Analysis of phytonutrients from palm concentrates by high performance liquid chromatography*. [thesis]. Kuala Lumpur: Faculty of Science University of Malaya; 2009.
15. Kumar SS, Saha AK, Kavitha K, Basu SK. *Evaluation of clobazam loaded ionically cross-linked microspheres using chitosan*. *Der Pharmacia Sinica*. 2012; 3(6):616-623.
16. Wakefield J.C. *Formaldehyde General Information*. Health Protection Agency. 2008.
17. ATSDR. *Toxicological profile for acetone*. USA: Public Health Service. U.S. Department of Health and Human Service. 1994.
18. SOP Farmakologi. *Standard Operational Procedure of MDA measurement*. Malang: Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. 2016.
19. World Health Organization. *Formaldehyde in drinking-water*. WHO Guidelines for Drinking-Water Quality. 2005.
20. American Chemistry Council Acetone Panel. *Acetone*. USA: Voluntary Children's Chemical Evaluation Program Submission. 2003.
21. Stang. *Cara praktis penentuan uji statistik dalam penelitian kesehatan dan kedokteran*. Jakarta: Mitra Wacana Media; 2014.
22. Niwa T, Takeuchi H, Hino T, Kunou N, Kawashima Y. *Preparations of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with D,L-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behavior*. *J. Control. Rel.* 1993 May; 25:89-98.
23. Bhattacharyya A, Ranajoy C, Sankar M, Sheila EC. *Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases*. *Physiol. Rev.* 2014 Apr; 94:329-354.
24. Khanna P, Cyntia O, Boon HB, Gyeong HB. *Nanotoxicity: an interplay of oxidative stress, inflammation and cell death*. *Nanomaterials*. 2015 Jun; 5(3):1163-1180.
25. Ayala A, Mario F, Sandro A. *Lipid peroxidation: production, metabolism and signaling mechanism of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal*. Spain: University of Seville; 2014.
26. Tan R, Mohamed S, Samaneh GF, Noordin M, Goh YM, Manap MY. *Polyphenol rich oil palm leaves extract reduce hyperglycaemia and lipid oxidation in STZ-rats*. *Int Food Res J*. 2011; 18(1):179-188.
27. Yamauchi R. *Vitamin E: Mechanism of its antioxidant activity*. *Food Sci Technol*. 1997 August; 3(4):301-309.
28. Al-Sou'od K, Rasha A, Mayyas A. *Surface activity of some low molecular weight chitosan derivatives*. *Jordan J. Chem*. 2013 Feb; 8(1):1-17.
29. Leonard SW, Eric G, Michael WD, Ronald JS, Maret GT. *Quantitation of rat liver vitamin e metabolites by LC-MS during high-dose vitamin e administration*. *J. Lipid Res*. 2005 May; 46(5):1068-1075.
30. Fairus S, Rosnah MN, Hwee MC, 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 Jan; 11(5):1-11.