

BAB II

KAJIAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Umum Tentang Kultur Sel Primer Ginjal Hamster

Perkembangan teknologi kultur jaringan hewan telah banyak diarahkan untuk mempelajari proses atau mekanisme yang terjadi pada sel, namun juga interaksi yang terjadi antar sel dengan lingkungan yang dapat diatur menyerupai berbagai keadaan fisiologis ataupun patologis (Achmad, 2000).

Kultur jaringan atau kultur sel primer dapat diperoleh dengan cara menumbuhkan sel dari potongan jaringan atau fragmen jaringan disebut eksplan primer, atau menggunakan enzim atau diperoleh secara mekanik. Kultur sel primer mempunyai sifat dapat bertahan hidup setelah dilakukan disagregasi, mempunyai sifat adhesif yaitu mampu melekat pada substrat. Beberapa segi fungsi khusus sel dapat diekspresikan lebih kuat dan jelas pada kultur sel primer, terutama setelah kultur itu menjadi konfluen. Pada fase ini kultur sel akan menunjukkan morfologi yang hampir serupa dengan jaringan asalnya (Trenggono, 2009).

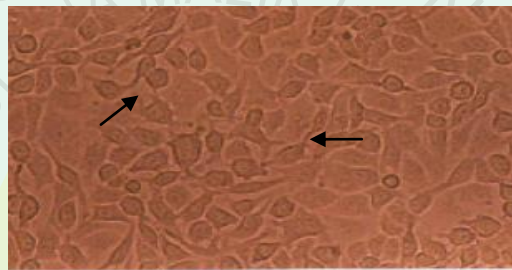
Kultur sel ginjal telah menjadi alat penting dalam mekanisme dan proses transportasi. Ginjal pada bagian tubulus proksimal adalah target untuk senyawa nefrotoksik, karena kemampuannya untuk mengangkut dan mengumpulkan xenobiotik, metabolit serta merupakan seperangkat organ selektif enzim biotransformasi (Gowder, 2010).

Ginjal bertindak sebagai organ ekskresi, transportasi, dan metabolisme. Dalam ginjal terkumpul sedikitnya 15 tipe sel yang berbeda, sehingga ginjal merupakan organ yang kompleks. Kultur sel ginjal sekarang secara rutin digunakan dalam laboratorium untuk meneliti kajian biologi sel dan molekular untuk memeriksa sel pada tingkat *single cell*. Tiap tipe sel mengeluarkan fenotip khusus dalam kultur yang ditandai dengan adanya kekhasan morfologi, unsur-unsur penting membran (reseptor hormon, integritas dan ektoenzim), protein intraseluler, sintesis dan pengeluaran produk khusus (matrix protein intraseluler, prostanoid, dan sitokinesis), secara khusus pada sel tubulus bisa mengirimkan transport aktif (Brenner, 1996).

2.2 Karakteristik Kultur Sel Primer Ginjal Hamster

Karakteristik sel secara *in vitro* bisa di indentifikasi dengan cara yang paling sederhana dan langsung dapat dipakai dalam identifikasi sel yaitu dengan melihat morfologi sel. Sebagian sel epitel yang tumbuh di tengah-tengah sel selapis yang konfluen mempunyai morfologi sel dengan kondisi yang berbeda. Sebagian sel epitel yang tumbuh di tengah-tengah sel selapis yang konfluen mempunyai morfologi sel yang teratur, berbentuk polygonal dengan batas yang jelas, sedang sel epitel yang tumbuh dibagian tepi sel selapis yang belum konfluen, mempunyai morfologi yang tidak teratur, bentuk sedikit memanjang, bahkan bisa mengalami transformasi bentuknya berubah menjadi fibroblastoid (Trenggono, 2009).

Istilah fibroblastik dan epithelia dipakai agak fleksibel pada kultur jaringan, istilah ini lebih sering menggambarkan morfologi sel dari pada asal-usul sel. Kultur sel ginjal mempunyai bentuk multipolar atau bipolar menyebar pada permukaan cawan kultur. Kultur sel ini setelah konfluen akan menjadi bipolar dan tidak menyebar. Sel yang dapat bermigrasi bipolar atau multipolar seperti sel ginjal disebut fibroblastik dan sel ini panjangnya lebih dari dua kali lebarnya (Gambar 2.1) (Trenggono, 2009).



Gambar 2.1 Karakteristik kultur sel BHK (Baby Hamster Kidney) berbentuk fibroblastoid dengan 10% FCS (Sekaran, 2010).

2.3 Pertumbuhan Kultur Sel Primer Ginjal Hamster

Pertumbuhan dan perkembangan sel tidak lepas dari siklus kehidupan yang dialami sel untuk tetap bertahan hidup. Siklus ini mengatur pertumbuhan sel dengan meregulasi waktu pembelahan dan mengatur perkembangan sel dengan mengatur jumlah ekspresi atau translasi gen pada masing-masing sel yang menentukan diferensiasinya (Trenggono, 2009).

Proliferasi sel merupakan proses pertumbuhan sel yang meliputi pembelahan sel secara aktif dan memerlukan suatu pengaturan. Proliferasi sel ini dilakukan untuk mengganti sel-sel yang rusak. Sel yang terbentuk dari hasil kultur

akan tumbuh mengikuti kurva pertumbuhan yang terbagi dalam 3 tahap yaitu fase lambat, fase eksponensial dan fase menetap (Trenggono, 2009).

Menurut Budiono (2002), pertumbuhan sel dalam sistem kultur terdiri dari 3 fase yaitu *Lag Phase*, *Log Phase* dan *Plateu Phase*. Pada *Lag Phase* konsentrasi sel adalah sama atau hampir sama dengan konsentrasi pada waktu subkultur. Fase ini juga disebut dengan fase adaptasi atau fase lambat, yaitu fase sel yang meliputi pelekatan pada substrat dan penyebaran sel. *Log Phase* merupakan fase terjadinya peningkatan jumlah sel secara eksponensial dan saat pertumbuhan mencapai konfluen, proliferasi akan terhenti setelah 1 atau 2 siklus berikutnya. Fraksi pertumbuhan pada fase ini mencapai 90-100%. *Plateu Phase* merupakan fase terjadinya penurunan dan berkurangnya kemampuan sel untuk tumbuh apabila sel telah mencapai konfluen. Pada fase ini fraksi pertumbuhan akan mencapai 0-10%.

Pertumbuhan sel ginjal ditentukan oleh waktu generasinya. Waktu generasi adalah periode antara suatu pembelahan sel dengan pembelahan sel berikutnya yang disebut waktu pembentukan, atau waktu pengendalian sel. Lamanya waktu generasi untuk tipe sel tertentu berbeda dengan tipe sel lain. Waktu generasi sel mamalia kira-kira 20 jam sedangkan generasi sel ginjal fetus hamster kira-kira 12 jam setelah inkubasi (Trenggono, 2009). Dalam waktu 48 jam kultur sel BHK-21 (*Baby Hamster Kidney*) sudah melekat pada substrat, 72 jam setelah inkubasi sel ini sudah hampir konfluen (Rahman, 2007).

Sel dikatakan konfluen jika sel tersebut menempel dan berkembang memenuhi wadah kultur (Djati, 2006). Konfluen sel adalah tumbuh homogen atau

meratanya sel sebagai sel monolayer sampai menutupi cover glass (Wulandari, 2003).

2.3.1 Kerusakan Sel Kultur Primer Ginjal Hamster

Moodie (2004) kerusakan sel merupakan perubahan atau gangguan yang dapat mengurangi viabilitas atau fungsi esensial sel. Stress oksidatif dapat menyebabkan kematian sel secara apoptosis dan nekrosis. Apoptosis adalah proses kematian sel secara terprogram berupa proses autodestruksi seluler aktif yang ditandai dengan penyusutan sel, kerusakan membran, dan fragmentasi DNA inti sel. Nekrosis merupakan kematian sel secara tiba-tiba akibat kerusakan berat yang ditandai kerusakan struktur seluler secara menyeluruh diikuti dengan lisisnya sel dan inflamasi jaringan.

2.3.2 Viabilitas Sel Kultur Primer Ginjal Hamster

Pertumbuhan sel dalam kultur dapat dilihat dari viabilitas sel, konfluen sel dan normal tidaknya sel. Viabilitas sel dapat didefinisikan sebagai jumlah sel-sel sehat dalam sampel. Apakah sel-sel secara aktif membelah atau diam tidak dibedakan. Pengujian viabilitas sel sering berguna ketika sel tidak membelah (seperti sel primer) yang terisolasi dan dipelihara dalam kultur untuk menentukan kondisi kultur optimal untuk populasi sel (Freshney, 2002).

Viabilitas sel merupakan perbandingan jumlah sel yang hidup dan sel yang mati (Wulandari, 2003). Viabilitas sel ditentukan dari kemampuan sel untuk hidup dan menjalankan metabolismenya dimana ini merupakan faktor yang mempengaruhi keberhasilan kultur sel (Prihastanti, 1999). Metode yang paling mudah untuk menentukan jumlah sel hidup adalah penghitungan sel dengan

menggunakan hemositometer dan menggunakan pewarna tripan biru 0,4% karena tripan biru tidak mengubah integritas membran plasma dan memperlambat proses kematian sel. Tripan biru juga memperkecil jumlah sel dan memfasilitasi identifikasi sel yang akan dilihat dengan mikroskop (Freshney, 2002).

2.3.3 Abnormalitas Sel Kultur Primer Ginjal Hamster

Sel dikatakan abnormal jika sel tersebut berukuran melebihi ukuran sel normal dan mengalami perubahan bentuk dari asalnya, terkontaminasi oleh bakteri dan jamur (Djati, 2006). Abnormalitas sel yang sering muncul pada kultur sel ditandai dengan adanya sel raksasa (sel giant) yaitu sel yang volume selnya, DNA, RNA, serta massa protein bertambah hingga 20-200 kali lipat dari sel normal (Freshney, 2000).

Abnormalitas sel yang lain biasanya ditandai dengan adanya nekrosis. Ciri-ciri sel yang mengalami nekrosis antara lain kromatin menggumpal, pembengkakan organel, kerusakan membran sel, keluarnya isi sel. Proses nekrosis sel dapat muncul sebagai respon terhadap rangsangan spesifik misalnya stress oksidatif. Stress oksidatif adalah suatu gangguan keseimbangan antara oksidan dan antioksidan yang menyebabkan rusaknya sel potensial (Moodie, 2004).

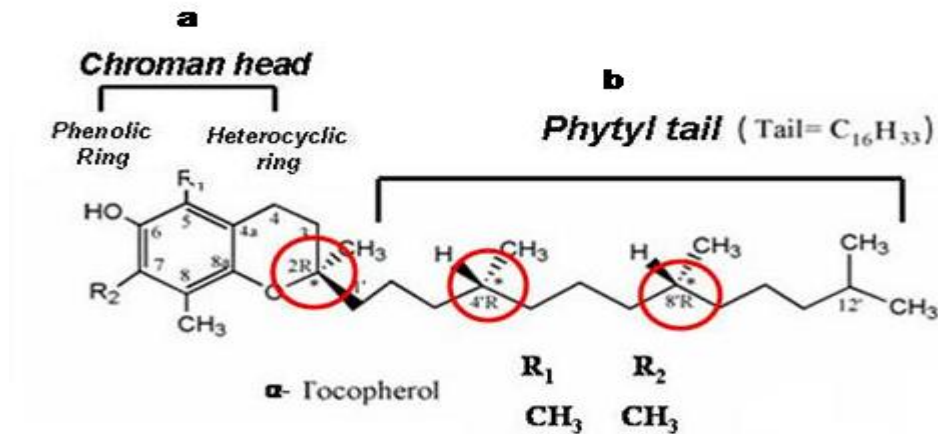
2.4 Vitamin E

2.4.1 Struktur Kimia Vitamin E (Alpha Tokoferol)

Terdapat sekelompok ikatan organik yang mempunyai aktivitas vitamin E. secara garis besar terdapat 8 buah ikatan yang dapat dikelompokkan menjadi dua: kelompok tokoferol dan kelompok tokotrienol (Sediaoetama, 2006). Vitamin E

istilah umum bagi delapan macam substansi alami yang bersifat lemak, yaitu : 4 tocopherol dan 4-tocotrienol. Diantara delapan macam substansi tersebut substansi α -tokoferol (Gambar 2.2) adalah jenis yang mempunyai aktivitas biologi yang tertinggi dan terdapat dalam jumlah besar dalam jaringan tubuh (Goodman and Gillman, 1991).

Diantara sifat fisik dari Vitamin E yaitu: semua bentuk vitamin e adalah minyak tidak dapat dikristalkan. Minyak ini mempunyai viskositas tinggi, larut dalam minyak dan zat pelarut lemak. Vitamin E stabil terhadap suhu, alkali dan asam (Sediaoetama, 2006). Secara kimiawi berdasarkan jumlah gugus metil pada inti aromatic tokotrienol, dikenal 6 jenis tokoferol, yaitu α , β , γ , δ , ϵ , dan Z. diantara keenam bentuk tokoferol tersebut, yang paling aktif adalah α -tokoferol. Oleh sebab itu, aktivitas Vitamin E diukur sebagai α -tokoferol (Winarsi, 2007). Tokoferol mengandung cincin aromatik tersubstitusi, dan rantai panjang isoprenoid sebagai rantai samping (Lehninger, 1982). Struktur kimia vitamin E terdiri atas rantai samping gugus merupakan nukleus methylated 6-chromanol (3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-6-ol), kemudian 3 unit isoprenoid, dan ikatan ester atau hidroksil bebas pada C-6 dari nukleus chromanol (Mustacich, *et.,al*,2007; Sareharto, 2010).



Gambar 2.2 Struktur kimia vitamin e, a. Bagian kepala yang disebut chroman terdiri atas cincin *phenol* dan cincin *heterocyclic*, b. bagian ekor yang disebut *phytyl* memiliki 3 isoprenoid (Pekiner, 2003).

2.4.2 Peran Vitamin E (α -tokoferol) pada Media Kultur

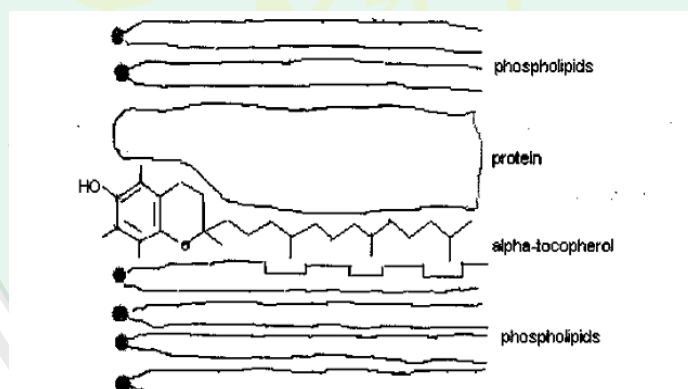
Penambahan vitamin E pada media kultur dapat meningkatkan proses penempelan eksplan mencit secara *in vitro* (Steele, 1990) dan hal tersebut dibuktikan dengan pewarnaan bahwa terlihat adanya peningkatan viabilitas embrio mencit yang dipapar panas (Arechiga, 1994). Menurut Seidel (2000), vitamin E yang ditambahkan pada media kultur memberi pengaruh positif terhadap perkembangan proliferasi sel embrio sapi yang dikultur secara *in vitro*. Hasil penelitian Sekaran (2010), kandungan vitamin E, karoten, dan fenolat pada minyak palm phenolik dapat mempercepat viabilitas sel pada kultur sel baby hamster kidney (BHK).

2.4.3 Peran Vitamin E (α -tokoferol) sebagai Antioksidan dalam Sel

Vitamin E berfungsi sebagai pemelihara keseimbangan intraselluler dan sebagai antioksidan (Alava *dkk.*, 1993). Sebagai antioksidan, Vitamin E berfungsi sebagai donor ion hydrogen yang mampu mengubah radikal peroksil (hasil peroksida lipid) menjadi radikal tokoferol yang kurang reaktif, sehingga tidak mampu merusak rantai asam lemak (Winarsi, 2007). Tokoferol terutama α -

tokoferol, telah diketahui sebagai antioksidan yang mampu mempertahankan integritas membran. Senyawa tersebut dilaporkan bekerja sebagai *scavenger* radikal bebas oksigen, peroksida lipid, dan oksigen singlet (Diplock, *et.al.*, 1989; Winarsi, 2007).

Vitamin E atau Tocopherols telah menjadi komponen membran sel biologi yang sangat penting dimana Vitamin E bertindak sebagai antioxidants dan berperan dalam stabilisasi membran. Vitamin E dideteksi paling banyak pada jaringan sel dan sebagian besar dalam membran, yang berada pada daerah PUFA (*Polyunsaturated Fatty Acid*). Hal itu tidak hanya karena α -tokoferol adalah lipofilik tetapi juga karena α tokoferol memiliki 16-carbon phytol dengan rantai sisi yang mampu membentuk suatu bagian integral membran (Gambar 2.3) (Pekiner, 2003).



Gambar 2.3 Letak Vitamin E (α -tokoferol) dalam struktur membran (Pekiner, 2003).

Vitamin E merupakan antioksidan (pencegah oksidasi) biologis yang berdiri sebagai benteng pertahanan pertama melawan peroksida lipid yang menghasilkan radikal bebas penyebab kerusakan jaringan. Selanjutnya diketahui bahwa tokoferol mempunyai kemampuan melumpuhkan “radikal bebas” (molekul

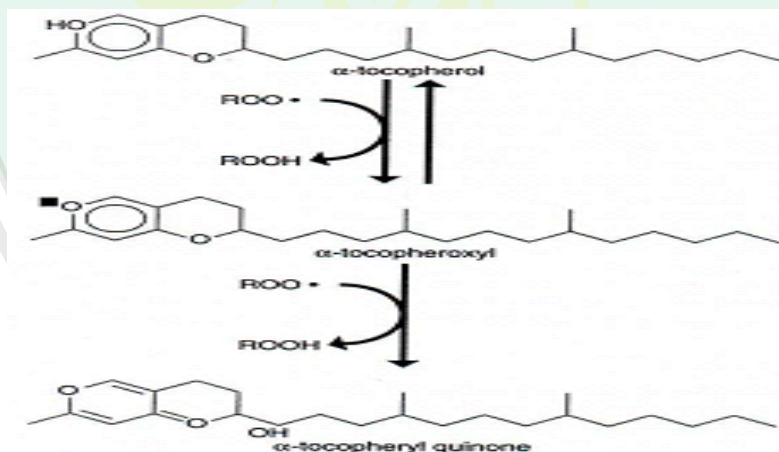
reaktif, pemicu oksidasi) dan melindungi membran sel dari serangan radikal bebas. Cara yang dilakukan oleh Vitamin E untuk melindungi membran sel dari serangan radikal bebas adalah dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas, sehingga melindungi *polyunsaturated fatty acid* (PUFA), protein, dan sitoskeleton seluler dari *oxidant injury* (Linder, 1992).

Masuknya Vitamin E ke dalam sel dapat terjadi melalui proses mediasi reseptor (LDL membawa vitamin ini ke dalam sel) atau melalui proses yang dibantu oleh lipoprotein lipase dimana Vitamin E dilepaskan dari kilomikron dan VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*). Di dalam sel, transpor intraseluler dari tokoferol membutuhkan protein pengikat tokoferol intraseluler. Vitamin E pada sebagian besar sel-sel non adiposa terdapat pada membran sel dimana dapat dimobilisasi (Mahan, *et.,al*, 2004; Sareharto, 2010). Transpor Vitamin E oleh polyunsaturated lipids menjamin perlindungan lipid tersebut terhadap radikal bebas, kadar tokoferol yang bersirkulasi cenderung sesuai dengan kadar total lipid dan kolesterol (Combs, *et., al*, 1998; Sareharto, 2010).

Vitamin E mempunyai kemampuan untuk mengurangi radikal bebas menjadi metabolit yang tidak berbahaya dengan memberikan gugus hidrogennya. Vitamin E dikenal sebagai komponen penting dari sistem pertahanan antioksidan seluler, yang melibatkan enzim-enzim yang lain seperti *superoksida dismutase* (SODs), *glutation peroksidase* (GPXs), *glutation reduktase* (GR), *katalase*, *tioeredoksin reduktase* (TR), dan faktor-faktor non enzim (misalnya glutation,

asam urat), yang banyak tergantung pada zat gizi esensial yang lain (Mahan, *et.,al*, 2004; Sareharto, 2010).

Dalam fungsinya sebagai antioksidan Vitamin E mengalami oksidasi primer menjadi *tocopherylquinone*, prosesnya melalui radikal *tocopheroxyl* semi stabil. Oksidasi monovalen tokoferol menjadi radikal *tocopheroxyl* adalah reaksi yang dapat kembali, tetapi proses oksidasi selanjutnya satu arah. *Tocopherylquinone* tidak mempunyai aktivitas Vitamin E, produksinya menggambarkan katabolisme dan hilangnya vitamin dari sistem. α -*tocopherylquinone* dapat tereduksi menjadi α -*tocopherylhydroquinone*, yang dapat terkonjugasi dengan asam glukoronat (Gambar 2.4) (Mahan, *et.,al*, 2004; Sareharto, 2010).



Gambar 2.4 Mekanisme vitamin E menangkap radikal bebas menjadi metabolit yang tidak berbahaya dengan memberikan gugus hidrogennya (Mahan, *et.,al*, 2004; Sareharto, 2010).

Vitamin E dapat didaur ulang dengan reduksi radikal *tocopheroxyl* kembali menjadi tokoferol. Beberapa mekanisme dikemukakan untuk reduksi *in vivo tocopheroxyl* oleh beberapa reduktan intraselular. Penelitian *in vitro*

menunjukkan bahwa proses ini dapat terjadi dalam liposom oleh asam askorbat (Vitamin C), dalam mikrosom oleh NADPH, dan dalam mitokondria oleh NADH dan suksinat, dengan dua sistem terakhir menunjukkan sinergisme dengan glutathion tereduksi (GSH) (Combs, *et. al*, 1998; Sareharto, 2010).

2.5 Etanol

2.5.1 Sifat Fisik dan Kimiawi Etanol

Etanol disebut juga etil alkohol dan termasuk ke dalam alkohol rantai tunggal, dengan rumus kimia C_2H_5OH dan rumus empiris C_2H_6O . Etanol merupakan isomer konstitusional dari dimetil eter. Etanol sering disingkat menjadi EtOH, dengan "Et" merupakan singkatan dari gugus etil (C_2H_5). Secara struktural, suatu alkohol merupakan gabungan dari alkana dan air. Dalam rumus alkohol terdapat gugus R- yang bersifat lipofilik dan gugus $-OH$ yang bersifat hidofilik. Adanya kedua unit struktur tersebut menentukan sifat-sifat alkohol. Gugus $-OH$ sangat polar dan dapat membentuk ikatan hydrogen dengan sesama molekul alkohol, dengan molekul netral, serta dengan anion. Akibat adanya ikatan hydrogen antar molekul maka titik didih alkohol lebih tinggi dari pada titik didih alkana yang berat molekulnya hampir sama (Masters, 2002).

Sifat kimia etanol adalah termasuk dalam alkohol primer, yang berarti bahwa karbon yang berikatan dengan gugus hidroksil paling tidak memiliki dua hidrogen atom yang terikat dengannya juga. Ini dipengaruhi oleh keberadaan gugus hidroksil dan pendeknya rantai karbon etanol. Gugus hidroksil dapat berikatan dengan ikatan hidrogen, sehingga membuatnya cair dan lebih sulit

menguap dari pada senyawa organik lainnya dengan massa molekul yang sama. Ikatan hidrogen menyebabkan etanol murni sangat higroskopis. Sifat gugus hidroksil yang polar menyebabkannya dapat larut dalam banyak senyawa ion (Miller and Mark, 1991).

2.5.2 Radikal Bebas Etanol dalam Sel

Radikal bebas merupakan salah satu bentuk senyawa oksigen reaktif, yang secara umum diketahui sebagai senyawa yang memiliki elektron yang tidak berpasangan (Winarsi, 2007). Radikal bebas mempunyai sifat reaktifitas tinggi, karena kecenderungan menarik elektron, serta dapat mengubah suatu molekul menjadi suatu radikal. Karena kecenderungannya untuk menarik elektron, maka sama halnya dengan oksidan, radikal bebas adalah penerima elektron. Karena itu radikal bebas digolongkan dalam oksidan, tetapi tidak setiap oksidan adalah radikal bebas. Radikal bebas cenderung membentuk radikal yang baru lagi apabila menjumpai molekul lain, sehingga terjadi reaksi rantai (*chain reaction*) dan bersifat merusak. Daya perusak radikal bebas jauh lebih besar dibandingkan dengan oksidan biasa. Reaksi rantai tersebut baru berhenti apabila radikal tersebut dapat diredam (Sareharto, 2010).

Pembentukan oksidan/radikal bebas yang melebihi *antioxidant defences capacity* menyebabkan kerusakan oksidatif, menimbulkan ROS, merusak komponen-komponen sel yang penting untuk mempertahankan integritas dan kehidupan sel. Komponen terpenting membran sel adalah fosfolipid, glikolipid, dan kolesterol. Dua komponen pertama mengandung asam

lemak tak jenuh (asam linoleat, linolenat dan arakhidonat) yang sangat rawan terhadap serangan radikal, terutama radikal hidroksil, menyebabkan reaksi rantai yang dikenal dengan peroksidasi lipid (*lipid peroxidation*), berdampak terputusnya rantai asam lemak menjadi berbagai senyawa yang bersifat toksik terhadap sel, antara lain aldehida, seperti malondialdehide (MDA), 9-hidroksi-nonenal serta bermacam-macam hidrokarbon seperti etana (C₂H₆) dan pentana (C₅H₁₂). Dapat pula terjadi ikatan silang (*cross-linking*) antara dua rantai asam lemak atau antara asam lemak dan rantai peptida (protein) yang timbul karena reaksi dua radikal. Hal-hal tersebut menyebabkan kerusakan parah membran sel tak terkecuali membran eritrosit (Sareharto, 2010).

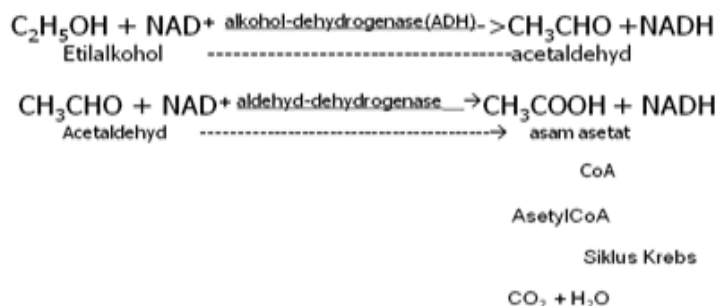
Perubahan pada DNA antara lain berupa: hidroksilasi basa timin dan sitosin, pembukaan inti purin dan pirimidin serta terputusnya rantai fosfodiester. Bila kerusakannya tidak terlalu parah maka masih bisa diperbaiki oleh sistem perbaikan DNA (DNA repair system), namun apabila kerusakan parah misalnya rantai terputus-putus di berbagai tempat, maka kerusakan tersebut tak dapat diperbaiki dan replikasi sel terganggu menimbulkan mutasi DNA. Oksidan dapat merusak protein karena dapat mengadakan reaksi dengan asam amino penyusun protein, diantaranya yang paling rawan adalah sistein. Sistein mengandung gugusan sulfhidril (SH) yang paling peka terhadap radikal bebas seperti radikal OH membentuk ikatan disulfida (-S-S-) sehingga protein kehilangan fungsi biologisnya (Sareharto, 2010).

Pembentukan oksidan atau radikal bebas yang melebihi *antioxidant defences capacity* menyebabkan kerusakan oksidatif dan meningkatkan ROS.

ROS adalah metabolit oksigen utama yang dihasilkan melalui reduksi satu elektron, yang terdiri dari hidrogen peroksida (H_2O_2), ion superoksida (O_2^-), radikal peroksil ($RCOO^-$), radikal bebas hidroksil (OH^-), dan singlet oksigen (O_2). Diantara senyawa oksigen reaktif ini yang paling berbahaya adalah OH^- karena mempunyai reaktivitas tinggi, dapat merusak 3 jenis senyawa yang penting untuk mempertahankan integritas sel, yaitu: asam lemak, khususnya asam lemak tak jenuh yang merupakan komponen penting fosfolipid penyusun membran sel, DNA, dan protein, yang memegang berbagai peran penting seperti enzim (Sareharto, 2010).

2.5.3 Metabolisme Etanol dalam Sel

Menurut Kallant (1971), proses metabolisme etanol (Gambar 2.5) melibatkan tiga jenis enzim. Pada proses pertama etanol dioksidasi menjadi *acetaldehyd* oleh enzim "*alkohol dehidrogenase*" dan memerlukan kovaktor NAD (*Nicotinamid Adenin Dinucleotida*). Pada tahap kedua *acetaldehyd* diubah menjadi asam asetat oleh enzim "*aldehid dehidrogenase*" yang juga memerlukan kovaktor NAD. Tahap berikutnya diubah lagi menjadi *acetyl coenzim A* (CoA), yang kemudian CoA masuk kedalam siklus krebs dan mengalami metabolisme menjadi CO_2 dan H_2O .



Gambar 2.5 Proses Biokimiawi Metabolisme etanol dalam sel (Kalant, 1971)

Pada mamalia, etanol dimetabolisme melalui tiga cara sesuai dengan enzim yang mereduksinya yaitu: *alcohol* (ADH) dan *aldehyd* (ALDH) *dehydrogenase* dengan NAD^+ sebagai kofaktor, sitosol dan katalase peroximal dengan H_2O_2 sebagai sistem mikrosomal oksidasi etanol yang berperan penting dalam cytochrome P4502E1 (CYP2E1) yang memerlukan NADPH dan O_2 (Stanczyk, 2005).

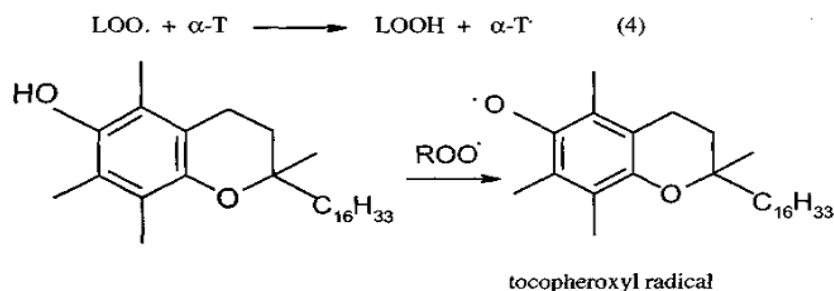
Jalur utama metabolisme alkohol meliputi *alcohol dehydrogenase* (ADH), yaitu enzim sitosol yang mengataliasi perubahan alkohol menjadi *acetaldehyde*. Selama perubahan etanol menjadi *acetaldehyde*, ion hidrogen ditransfer dari alkohol pada *nicotinamide adenine dinucleotide* (NAD^+) untuk membentuk NADH. *Mitochondrial NAD^+ dependent aldehyde dehydrogenase* merupakan jalur utama oksidasi *acetaldehyde*. Produk reaksi ini adalah acetate, yang mana selanjutnya mengalami metabolisme menjadi CO_2 dan H_2O . Konsumsi alkohol kronis akan meningkatkan oksidasi acetaldeyde dalam mitokondria (Masters, 2002).

2.6 Mekanisme aksi Vitamin E (α -Tokoferol) terhadap toksisitas Etanol

Radikal bebas adalah molekul yang sangat reaktif yang diproduksi oleh sumber selular dan lingkungan. Molekul-molekul tidak stabil menyerang sel-sel sehat, melemahnya membran sel dan menyebabkan kerusakan sel dan penyakit. Asam lemak tak jenuh ganda sangat rentan terhadap serangan radikal bebas. Vitamin E adalah salah satu agen untuk mencegah penyebaran peroksidasi yang disebabkan oleh radikal bebas melalui asam lemak fosfolipid sebagai antioksidan pemecah rantai (Pekiner, 2003).

Vitamin E mempunyai kemampuan antioksidan dalam memutus reaksi rantai di antara Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) dalam membran dimana dia berada, hal ini karena reaktifitas dari *phenolic hydrogen* pada kelompok C-6 hidroksil dan kemampuan dari sistem cincin *chromanol* untuk menstabilkan elektron yang tidak berpasangan. Kemampuan ini, yang disebut "penyapu" radikal bebas, melibatkan donasi hidrogen phenol ke radikal bebas dari asam lemak (atau O₂⁻) untuk melindungi serangan senyawa tersebut pada PUFAs yang lain (Combs, *et. al.*, 1998; Sareharto, 2010).

Menurut hipotesis Diplock dan Lucy, yang didasarkan pada studi model molekuler, vitamin E dapat menstabilkan membran biologis berdasarkan interaksi lipid-lipid antara rantai samping *phytyl* dan rantai asil lemak PUFA, terutama yang berasal dari *asam arakidonat* (Gambar 2.6). Dengan ini fungsi radikal bebas *scavenging* dapat digunakan ke arah peroksidasi PUFA, dan lokalisasi vitamin E membantu menjaga integritas membran dan permeabilitas, sehingga mengendalikan tidak spesifiknya metabolisme sel dan fungsi sel (Pekiner, 2003).



Gambar 2.6 Reaksi penangkapan Radikal hidroksil oleh Tokoferol (Pekiner, 2003)

Etanol selain mempengaruhi otak juga melibatkan organ-organ vital lainnya seperti ginjal, hati dan jantung. Etanol juga menyebabkan kehilangan viabilitas dan diferensiasi sel (Memon, 2009). Target utama oksidasi etanol yaitu pada tingkat membran sel dan terkait dengan kematian sel yang berlebihan. Selain itu, dijelaskan pula pemberian etanol selama 24 jam sudah mampu berikatan positif terhadap mobilitas lateral membran lipid pada sel kultur dan menurunkan viabilitas sel (Chen, *et.al.*, 1996).

Etanol larut dalam air, sehingga akan benar-benar mencapai setiap sel setelah dikonsumsi (Miller dan Mark, 1981). Secara langsung dan tidak langsung metabolisme etanol mempengaruhi stress oksidatif. Sebagaimana rusaknya keseimbangan antara proses pro-oksidatif dan oksidatif. Secara langsung pengaruh etanol ada pada perkembangan stress oksidatif yang berhubungan dengan perbedaan radikal bebas hydroxyl dan hidroxilethil, ROS (*Reactive Oxigen Spesies*) yang bereaksi dengan protein, lipid, dan mempengaruhi peroksidanya. Target utamanya adalah stress oksidatif pada DNA mitokondria, yang merusak sistem pusat mitokondria dan menghambat sintesis protein pada mitokondria (Stanczyk, *et.al.*, 2005).

Etanol mengganggu transport ion pada daerah membran. Penelitian in vitro menunjukkan bahwa ion Na^+ , K^+ , dan ATPase dihambat oleh etanol. Etanol mudah sekali masuk melalui membran sel dengan difusi karena sifatnya yang mudah larut dalam air dan lemak, merupakan penghantar listrik yang lemah, dan ukuran molekulnya relatif kecil, maka. Etanol mempengaruhi proliferasi sel yang dikultur, etanol dapat menurunkan jumlah sel yang hidup secara in vitro dengan memperlambat proliferasi sel dan meningkatkan kejadian kematian sel (Hamada, 2002).

Kerusakan sel akibat etanol disebabkan interaksinya dengan membran yang akan menyebabkan terpengaruhnya fungsi membran dalam menyampaikan signal antar sel. Pemberian etanol pada isolat hepatosit menyebabkan perubahan yang besar pada permukaan sel berupa penonjolan (blebs). Penyebab terbentuknya blebs adalah akibat terganggunya stabilitas membran sel (Hasky, 1978).

Dalam menjalankan fungsinya sebagai antioksidan, Vitamin E berubah bentuk dari bentuk alkoholnya menjadi suatu bentuk antara radikal semistabil, radikal *tocopheroxyl* (atau *chromanoxyl*). Tidak seperti radikal bebas yang dibentuk dari PUFA, radikal *tocopheroxyl* relatif tidak reaktif sehingga dapat menghentikan proses penyebarluasan perusakan oleh peroksidase lipid. *Tocopheroxyl* cukup stabil bereaksi dengan suatu radikal peroksil yang kedua untuk membentuk senyawa inaktif, produk nonradikal termasuk tocopherylquinone. α -Tokoferol dapat bersaing dengan radikal peroksil lebih cepat dibanding PUFA, sejumlah kecil vitamin mampu untuk

memberikan efek proteksi antioksidan dalam jumlah besar (Combs, *et., al*, 1998; Sareharto, 2010).

2.7 Kajian Al-Quran dan As-Sunnah

Segala sesuatu dalam hidup ini diciptakan oleh Allah swt secara seimbang, alam diciptakan oleh Allah beserta isinya secara seimbang, ada langit, bumi, gunung-gunung dan lautan. Susunan tubuh makhluk hidup juga diciptakan Allah dengan seimbang, keseimbangan itu bisa dilihat dengan adanya berbagai macam organ yang diciptakan untuk memenuhi susunan tubuhnya. Organ disusun oleh beberapa sistem organ, sistem organ disusun oleh beberapa rangkaian jaringan, dari setiap jaringan yang ada dalam tubuh disusun oleh banyak sel. Tiap satu sel juga disusun dengan beberapa komponen-komponen didalam sel (membran sel dan organel didalam sel). Maha besar Allah yang telah menciptakan segala bentuk dengan keseimbangan, firman Allah dalam Alqur'an surat al- Infithar ayat 7-8:

الَّذِي خَلَقَكَ فَسَوَّاكَ فَعَدَلَكَ ﴿٧﴾ فِي أَيِّ صُورَةٍ مَّا شَاءَ رَكَّبَكَ ﴿٨﴾

"Yang Telah menciptakan kamu lalu menyempurnakan kejadianmu dan menjadikan (susunan tubuh)mu seimbang. Dalam bentuk apa saja yang dia kehendaki, dia menyusun tubuhmu."

Allah menciptakan dan menyempurnakan segala kejadian dan menyusun kejadian tersebut dalam bentuk seimbang. Misal unit fungsional dan struktural terkecil dari makhluk hidup yaitu sel. Sel diciptakan allah dengan bentuk yang kecil bertujuan agar mudah melakukan metabolisme. Sel berukuran mikro agar mudah menyerap partikel-partikel yang juga berukuran mikro, sehingga bisa

memenuhi kondisi tubuh dan menjalankan keseimbangan. Dalam kondisi *in vitro* bentukan sel yang kecil tersebut akan berkomunikasi dan saling berlekatan dengan sel-sel sekitar membentuk suatu bentukan yang kompak dan menjalankan fungsi bersama-sama.

Keseimbangan penciptaan Allah tidak hanya dalam bentuknya saja, melainkan juga fungsi-fungsi fisiologis organ-organ tubuh yang rumit seperti proses metabolisme makhluk hidup. Jika proses metabolisme di dalam sel seimbang, maka proses proliferasi pun tidak terkendala. Proliferasi sel merupakan proses pertumbuhan sel yang meliputi pembelahan sel secara aktif dan memerlukan suatu pengaturan (Trenggono, 2009).

Ketidak seimbangan sel dalam melakukan metabolisme sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor yang ada disekitarnya, baik yang berasal dari dalam sel itu sendiri (*endogenous*) misalnya proses transportasi sel yang tidak normal, maupun yang berasal dari luar sel (*eksogenous*) misalnya radiasi, hiperoksia dan bahan kimia. Ketidak seimbangan karena faktor-faktor tersebut bisa menyebabkan suatu penyakit (Olson and Seidel, 2000).

Etanol merupakan bahan kimia yang menyebabkan proses metabolisme tidak seimbang. Etanol termasuk jenis alkohol yang bisa memabukkan jika dikonsumsi secara berlebihan. Dalam hal ini telah dijelaskan Allah Swt. dalam firman-Nya Q.S Al-Baqoroh ayat 219:

﴿ يَسْأَلُونَكَ عَنِ الْخَمْرِ وَالْمَيْسِرِ قُلْ فِيهِمَا إِثْمٌ كَبِيرٌ وَمَنْفَعٌ لِلنَّاسِ وَإِثْمُهُمَا أَكْبَرُ مِنْ نَفْعِهِمَا ۗ وَيَسْأَلُونَكَ مَاذَا يُنْفِقُونَ قُلِ الْعَفْوَ ۗ كَذَلِكَ يُبَيِّنُ اللَّهُ لَكُمْ آيَاتِهِ لَعَلَّكُمْ

تَتَفَكَّرُونَ ﴿٢١٩﴾

"Mereka bertanya kepadamu tentang khamar dan judi. Katakanlah: "Pada keduanya terdapat dosa yang besar dan beberapa manfaat bagi manusia, tetapi dosa keduanya lebih besar dari manfaatnya". dan mereka bertanya kepadamu apa yang mereka nafkahkan. Katakanlah: " yang lebih dari keperluan." Demikianlah Allah menerangkan ayat-ayat-Nya kepadamu supaya kamu berfikir.

Menurut penafsiran dari Al-Maghrabi خمر الشبى diambil dari kata خمر الشبى, pengertiannya ialah: apabila sesuatu itu ditutupi (menutupi), dikatakan dengan nama itu karena khamr menghilangkan kesadaran akal. Sesungguhnya Nabi Muhammad SAW telah bersabda,

"Setiap yang memabukkan adalah khamer dan setiap khamer adalah haram"

Hadis tersebut menguatkan bahwa setiap yang memabukkan adalah khamer dan haram untuk mengkonsumsinya. Minuman beralkohol memiliki campuran terbesar etanol yang bersifat memabukkan sehingga tergolong jenis khamer dan haram untuk mengkonsumsinya. Firman Allah Swt. dalam Surat al-Maidah ayat 90 :

يَتَأْتِيهَا الَّذِينَ ءَامَنُوا إِنَّمَا الْخَمْرُ وَالْمَيْسِرُ وَالْأَنْصَابُ وَالْأَزْلَامُ رِجْسٌ مِّنْ عَمَلِ الشَّيْطَانِ
فَاجْتَنِبُوهُ لَعَلَّكُمْ تَفْلِحُونَ ﴿٩٠﴾

90. Hai orang-orang yang beriman, Sesungguhnya (meminum) khamar, berjudi, (berkorban untuk) berhala, mengundi nasib dengan panah[434], adalah termasuk perbuatan syaitan. Maka jauhilah perbuatan-perbuatan itu agar kamu mendapat keberuntungan.

Allah memerintahkan untuk tidak meminum khamer agar mendapat keberuntungan. Secara tidak langsung dalam ayat ini bermaksud menjelaskan bahwa khamer yang lazimnya disebut alkohol memiliki kandungan etanol yang menyebabkan bahaya terhadap kesehatan tubuh. Imam Al-Maghrabi menjelaskan

dalam tafsir Al-maghrabi bahaya konsumsi khamer dari prespektif kesehatan dapat merusak sistem pencernaan makanan, perut menjadi buncit, pucat dan loyo, penyakit jantung dan mengakibatkan turun dan lemahnya daya kerja organ-organ tubuh.

Khamr atau yang disebut etanol secara langsung berpengaruh terhadap stress oksidatif yang berhubungan dengan turunan radikal bebas: *hidroksil dan hidroxyethyl*, dan *reaktif oksigen spesies* (ROS), yang bereaksi dengan protein dan lipid yang menginduksi peroksida, target utama stress oksidatifnya adalah DNA mitokondria (Castilla, *et.al.*, 2004). Secara tidak langsung etanol mempengaruhi perbedaan stress oksidatif yang berhubungan dengan lemahnya sistem intraseluler “pertahanan antioksidan enzimatis” (GSH, Px, katalase, superoksidatif/SOD), dan molekul yang larut atau tidak larut air (vitamin C, vitamin E, glutation, selenium) (Castilla, *et.al.*, 2004).

Sesungguhnya Allah telah memerintahkan kepada manusia untuk memakan bahan makanan yang baik dan halal (*halalan thayyiban*) agar bisa mencegah terjadinya penyakit. Ayat al-Qur’an dibawah ini menunjukkan hal tersebut :

يَتَأْتِيهَا النَّاسُ كُلُّوا مِمَّا فِي الْأَرْضِ حَلَالًا طَيِّبًا وَلَا تَتَّبِعُوا خُطُوتِ الشَّيْطَانِ إِنَّهُ لَكُمْ

عَدُوٌّ مُّبِينٌ ﴿١٦٨﴾

“Hai sekalian manusia, makanlah yang halal lagi baik dari apa yang terdapat di bumi, dan janganlah kamu mengikuti langkah-langkah syaitan; Karena Sesungguhnya syaitan itu adalah musuh yang nyata bagimu” (*al-Baqoroh* ayat 168).

Sesungguhnya Allah memerintahkan kepada kita untuk memakan makanan yang halal dan baik, Persyaratan makanan yang baik (*thayyib*) menurut ilmu gizi adalah makanan yang dapat memenuhi fungsi-fungsi bagi tubuh. Semakin banyak fungsi yang dipenuhi oleh bahan pangan semakin baik sifatnya. Vitamin merupakan salah satu zat gizi yang sangat penting bagi kesehatan tubuh dan merupakan senyawa organik yang diperlukan tubuh dalam jumlah sedikit, tetapi penting untuk mempertahankan kehidupan dan kesehatan.

Salah satu jenis vitamin yang berfungsi sebagai pemelihara keseimbangan intraselluler dan sebagai antioksidan adalah vitamin E (Alava *dkk.*, 1993). Antioksidan merupakan zat yang anti terhadap radikal bebas yang bekerja sebagai oksidan. Vitamin E berfungsi sebagai antioksidan dengan mendonorkan ion hydrogen yang mampu mengubah radikal peroksil (hasil peroksida lipid) menjadi radikal tokoferol yang kurang reaktif, sehingga tidak mampu merusak rantai asam lemak (Winarsi, 2007). Kandungan vitamin E bahkan sebagai sistem pertahanan atau antioksidan tubuh.