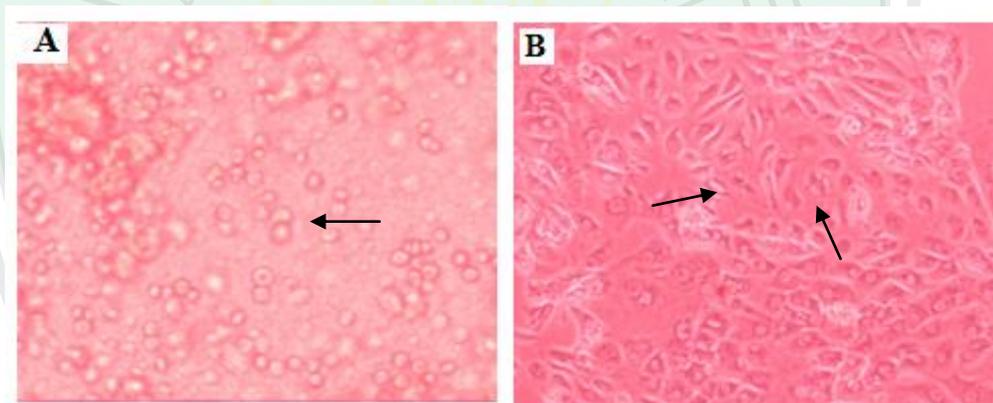


BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Kultur Sel Primer Ginjal Hamster

Kultur sel ginjal hamster diperoleh dari ginjal hamster (*Mesocricetus auratus*) yang berumur tidak lebih dari 10 hari yang ditumbuhkan dalam medium DMEM yang mengandung 20% FBS. Penggunaan fetus ginjal sebagai sumber kultur karena ginjal fetus masih bersifat totipoten sehingga kemampuan proliferasinya masih tinggi dibandingkan sel ginjal yang berasal dari hewan dewasa. Hasil kultur sel primer ginjal hamster dapat dilihat pada gambar berikut.



Gambar 4.1 Hasil kultur sel primer ginjal dalam media DMEM yang mengandung 20% FBS dilihat dalam mikroskop inverted.

Keterangan :

- A. Kultur primer ginjal umur 1 hari (100x), Gambar anak panah menunjukkan sel sudah menempel pada substrat, bentuk sel yang bulat-bulat tetapi belum berlekatan satu sama lain.
- B. Kultur primer ginjal umur 3 hari 60% konfluen (200x), Gambar anak panah menunjukkan sel saling berlekatan.

Pada gambar 4.1 menunjukkan bahwa pada hari ke-1 sel telah mengalami perlekatan dan perkembangan, berdasarkan fase pertumbuhan maka tahapan ini terdapat pada tahap *lag phase* (fase adaptasi). Sedangkan hari ke- 3 dan 4 sel semakin berkembang yang ditandai dengan perlekatan sel pada *attachment site*,

dan berhubungan antar sel. Hal ini menunjukkan sel terus mengalami proliferasi dan telah mengalami konfluen, tahapan ini disebut dengan tahap *log phase* (fase eksponensial). Hasil pengamatan ini sesuai dengan penjelasan Budiono (2002) bahwa konfluen sel yaitu permukaan substrat untuk pertumbuhan sel sudah terpakai dan sel saling berhubungan dengan sekitarnya. Menurut Rahman (2007) menjelaskan bahwa kultur sel ginjal membelah dengan cepat selama 48 jam dan akan melengkapi lapisan konfluen dengan 72 jam setelah inkubasi.

Melekatnya sel pada substrat disebabkan karena beberapa faktor, antara lain adalah medium. Medium yang digunakan untuk kultur sel harus menyediakan nutrisi esensial yang dibutuhkan untuk pembelahan sel seperti asam amino, asam lemak, ion, vitamin dan kofaktor. Pada penelitian ini medium yang digunakan adalah DMEM. Medium ini spesifik digunakan dengan suplementasi serum dan pertumbuhan dengan densitas sel yang tinggi. DMEM mengandung banyak asam amino yang dibutuhkan untuk pertumbuhan sel. Serum menyediakan asam amino, faktor pertumbuhan, vitamin, protein, hormon, lipid dan mineral. Fungsi utama dari serum adalah menstimulasi pertumbuhan dan aktivitas selular yang melibatkan hormon dan faktor pertumbuhan, meningkatkan adhesi selular melalui protein spesifik, dan menyediakan protein untuk transport hormon, mineral dan lipid. (Freshney, 2002). Antibiotik ditambahkan ke dalam medium kultur berperan untuk mencegah pertumbuhan mikroba. Antibiotik yang diberikan ada dalam jumlah sedikit karena bersifat sitotoksik. (Freshney, 2002).

Perlekatan sel dengan substrat difasilitasi oleh molekul-molekul protein membran tertentu. *Focal contact* merupakan bentuk lain dari struktur yang mengikat sel dengan substrat. *Focal contact* ditemukan pada sel-sel yang

dipelihara dalam kondisi *in vitro*. Beberapa waktu setelah suspense sel diteteskan ke dalam cawan, sel-sel akan mulai menempel pada permukaan cawan yang menjadi substratnya. Penempelan ini akan dilanjutkan dengan pembentukan juluran-juluran sel. Dengan terbentuk juluran yang semakin panjang perlekatan sel dengan substrat menjadi semakin kuat. Sel selanjutnya akan memipih dan melebar (*Spreading*) di atas permukaan substrat (Istanti, *dkk.*, 1999).

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa kultur sel primer ginjal berbentuk menyerupai sel fibroblas, yakni panjangnya dua kali dari pada lebarnya, dan berbentuk polygonal, Trenggono (2009) menjelaskan bahwa karakteristik 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.

4.2 Pengaruh Vitamin E (α -Tokoferol) terhadap persentase kerusakan sel yang dipapar etanol pada kultur primer ginjal hamster

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis statistik dengan anava tunggal tentang pengaruh Vitamin E (α -Tokoferol) terhadap persentase kerusakan biakan kultur sel primer ginjal hamster yang dipapar etanol diperoleh data yang menunjukkan bahwa F hitung $>$ F table 1%. Hal ini menunjukkan bahwa Vitamin E mampu mengurangi persentase kerusakan biakan kultur sel primer ginjal hamster yang dipapar etanol. Hasil uji anava bisa dilihat pada table 4.1 :

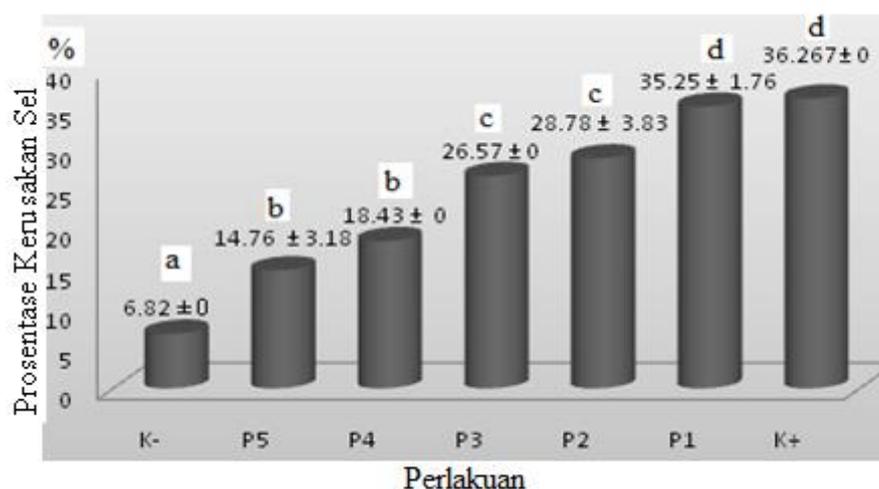
Tabel 4.1 Ringkasan anava tunggal tentang pengaruh Vitamin E (α -Tokoferol) terhadap persentase kerusakan biakan sel yang dipapar etanol pada kultur primer ginjal hamster

SK	db	JK	KT	F hitung	F table 1%
Perlakuan	6	2154,09	359,015	89,98	4.46**
Galat	14	55,83	3.99		
Total	20				

Keterangan **: Berbeda sangat nyata

Hasil analisis data yang tercantum pada tabel 4.1 menunjukkan bahwa pemberian Vitamin E (α -Tokoferol) memberikan efek terhadap persentase kerusakan biakan sel yang dipapar etanol. Hal ini menunjukkan bahwa α -Tokoferol mampu melindungi sel dari kerusakan akibat etanol dengan tetap mempertahankan konfluen biakan sel. Untuk mengetahui perbedaan perlakuan, maka dilakukan uji lanjut BNT dengan tingkat signifikansi 1%. Berdasarkan hasil uji BNT dari rata-rata persentase kerusakan biakan sel kultur maka didapatkan notasi BNT seperti pada gambar 4.2

Gambar 4.2 Grafik rata-rata tentang pengaruh Vitamin E (α -Tokoferol) terhadap persentase kerusakan biakan sel yang dipapar etanol pada kultur primer ginjal hamster



Keterangan :

1. K+ (Biakan sel kultur tanpa pemberian Vitamin E, dan dipapar etanol 24 jam)
2. P1 (Biakan sel kultur yang telah diberi Vitamin E 25 μ M dan dipapar etanol 10 mM selama 24 jam)
3. P2 (Biakan sel kultur yang telah diberi Vitamin E 50 μ M dan dipapar etanol 10 mM selama 24 jam)
4. P3 (Biakan sel kultur yang telah diberi Vitamin E 75 μ M dan dipapar etanol 10 mM selama 24 jam)
5. P4 (Biakan sel kultur yang telah diberi Vitamin E 100 μ M dan dipapar etanol 10 mM selama 24 jam)
6. P5 (Biakan sel kultur yang telah diberi Vitamin E 125 μ M dan dipapar etanol 10 mM selama 24 jam)
7. K- (Biakan sel kultur yang tanpa diberi vitamin E dan etanol)

Berdasarkan hasil uji BNT 1% tersebut dapat diketahui bahwa konsentrasi 25 μ M pemberian vitamin E tidak berbeda nyata dengan kontrol positif. Konsentrasi 50 μ M mulai memberikan perbedaan nyata dengan kontrol positif dan konsentrasi efektif pada penelitian ini adalah pada 100 μ M.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa 24 jam inkubasi etanol konsentrasi 10 mM tanpa suplementasi vitamin E (kontrol positif) mampu merusak sel-sel yang *spreading* 36,27% (Gambar 4.3), diduga karena interaksi sel dengan lingkungannya mengalami gangguan. Hal ini berhubungan dengan interaksi sel baik secara fisik yaitu perlekatan sel dengan substrat, perlekatan sel dengan sel, dan interaksi kimiawi diantaranya protein membran yang membantu sel-sel untuk berkomunikasi.

Hubungan antar sel dengan substrat dimediasi dengan adanya integrin yang merupakan suatu protein transmembran yang mempunyai tempat ikatan dengan berbagai material ekstra sel seperti fibronectin, kolagen ataupun proteoglikan (Rudijanto dan Handono, 2006).



Gambar 4.3 Biakan sel kultur primer ginjal hamster tanpa pemberian vitamin E yang kemudian dipapar etanol (200 x), C. menunjukkan sel-sel terlepas dari *attachment site* dan tidak berikatan satu dengan yang lain

Membran sel yang melekat pada substrat banyak mengandung integrin (biasanya integrin $\alpha 5 \beta 1$). Integrin-integrin ini mengikatkan substrat atau materi ekstrasel yang melapisi substrat dengan sitoskeleton. Struktur ini yang disebut *focal contact*. Pada saat membran sel mulai menempel pada substrat, protein-protein integrin dan mikrofilamen akan menyusun diri membentuk *focal contac* di tempat membran menempel pada substrat (Istanti, dkk., 1999).

Perlekatan sel dengan sel termasuk interaksi fisik yang melibatkan komponen membran yaitu protein integral membran. Protein-protein ini menyusun suatu struktur yang disebut junction. Protein-protein tersebut antara lain selectin, molekul dari kelompok besar immunoglobulin, integrin dan cadherin. Cadherin mengikat sel yang satu dengan sel yang lain melalui ikatan antar cadherin sejenis yang terdapat pada permukaan kedua sel. Bentuk ikatan tersebut menyebabkan sel-sel hanya dapat berikatan dengan sel-sel lain yang sejenis (Istanti, dkk., 1999).

Melepasnya sel dari substrat dan terpisah-pisahannya sel satu dengan yang lain terjadi karena interaksi fisik dan kimiawinya terganggu akibat radikal etanol

yang merusak membran. Berat molekul etanol sangat rendah sehingga etanol dengan mudah masuk dan melewati membran, ketika etanol berada pada membran, etanol menyebabkan radikal bebas pada membran, menimbulkan ROS, dan merusak komponen-komponen sel yang penting untuk mempertahankan integritasnya.

Komponen membran sel sebagian besar adalah fosfolipid, glikolipid dan kolesterol yang banyak mengandung asam lemak tak jenuh yang rawan terhadap radikal bebas. Jika radikal tersebut terus bereaksi maka akan menimbulkan *peroxidasi lipid* yang mengakibatkan terputusnya rantai-rantai asam lemak dan terjadi *cross linking* antara dua asam lemak atau asam lemak dengan protein, inilah pemicu terjadinya kerusakan parah membran sel yang berpengaruh pada fungsi membran sel sebagai penyampai signal untuk komunikasi sel dengan lingkungannya.

Radikal yang ditimbulkan oleh etanol bisa berupa radikal hidroksil (*OH) atau hidroxyetil (CH₃C*) (Stanczyk, *dkk.*, 2005). Radikal ini menyebabkan ikatan fosfolipid membran rusak, sehingga menyebabkan terpengaruhnya fungsi membran dalam menyampaikan signal antar sel (Hasky, 1978), dan mengganggu transport ion pada daerah membran sel (Hamadah, 2002).

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 (H₂O₂), ion superoksida (O⁻), radikal peroksil (RCOO⁻), radikal bebas hidroksil (OH⁻), dan singlet oksigen (O₂). Diantara senyawa oksigen reaktif ini yang paling berbahaya adalah

OH- karena mempunyai reaktifitas 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).

Gugus Hidroxil pada etanol akan mengikat protein, glikoprotein yang ada pada permukaan membran. Hal ini sesuai yang dijelaskan Miller dan Mark (1991) bahwa “sifat gugus hidroxil etanol adalah polar menyebabkan dapat larut dalam banyak senyawa-senyawa ion”. Sehingga diduga etanol melarutkan senyawa-senyawa organik permukaan membran sel, antara lain : GAGs (Glikosaminaglikans) merupakan rantai-rantai polisakarida yang berfungsi memberi isyarat kimiawi diantara sel. Integrin yang merupakan protein ekstraseluler yang membantu sel melekat pada matriks, berinteraksi dengan zat ekstra seluler, seperti kolagen, fibrin, heparin dan dengan reseptor membran spesifik pada sel-sel responsif.

Pemberian vitamin E konsentrasi 25 μ M belum memberikan pengaruh terhadap kerusakan biakan sel kultur, hal ini diduga karena pada konsentrasi tersebut vitamin E belum bisa mempertahankan integritas membran sel, sehingga berpengaruh pada interaksi sel baik secara fisik maupun kimiawi. Sedangkan pada konsentrasi 50 μ M vitamin E mulai memberikan pengaruh menurunkan persentase kerusakan biakan sel yang disebabkan oleh 10 mM etanol. Dan konsentrasi 100 μ M merupakan konsentrasi efektif dalam menurunkan persentase biakan sel kultur.

Pada konsentrasi 100 μM Vitamin E efektif mempertahankan konfluen sel dan mengurangi persentase kerusakan biakan sel diduga karena vitamin E mampu mempertahankan integritas membran dan mempertahankan penempelan eksplan. Stele (1990) menyatakan bahwa penambahan Vitamin E pada media kultur dapat meningkatkan proses penempelan eksplan mencit secara *in vitro*.

Pekiner (2003) menyatakan bahwa aksi antioksidan Vitamin E dekat dengan permukaan membran. Grup *metil* dari rantai *phytil* menyusun ikatan double. Sedangkan gugus *hydroxyl* dari cincin *chromanol* dan bagian polar dari fosfolipid bersama-sama berada pada permukaan membran sel. Lokalisasi vitamin E seperti ini membantu menjaga integritas membran dan permeabilitas, sehingga mengontrol tidak spesifiknya metabolisme dan fungsi sel.

4.3 Pengaruh Vitamin E (α -Tokoferol) terhadap viabilitas sel yang dipapar etanol pada kultur primer ginjal hamster

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis statistik dengan anava tunggal tentang pengaruh α -Tokoferol terhadap viabilitas kultur sel primer ginjal hamster yang dipapar etanol diperoleh data yang menunjukkan bahwa F hitung $>$ F table 1%. Hal ini menunjukkan bahwa rata-rata viabilitas sel pada kelompok perlakuan pemberian α -Tokoferol dan etanol memberikan pengaruh beda nyata sebagaimana tercantum dalam table 4.2

Tabel 4.2 Ringkasan Anava tunggal tentang pengaruh Vitamin E (α -Tokoferol) terhadap viabilitas sel yang dipapar etanol pada kultur primer ginjal hamster

SK	db	JK	KT	F hitung	F table 1%
Perlakuan	6	2846.6	474.44	49.22	4.46**
Galat	14	134.95	9.64		
Total	20	2981.56			

Keterangan **: Berbeda sangat nyata

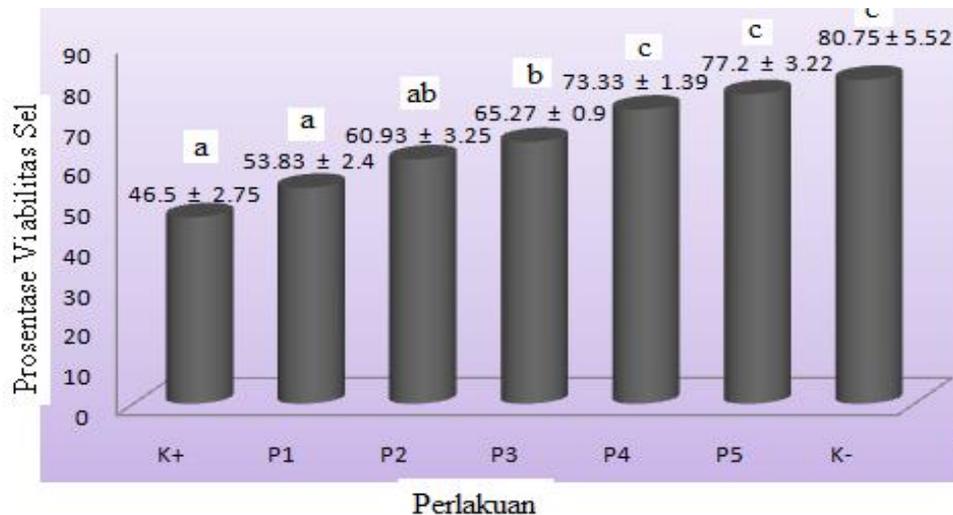
Hasil analisis data yang tercantum pada tabel 4.1 menunjukkan bahwa pemberian α -Tokoferol memberikan efek terhadap viabilitas sel yang dipapar etanol. Hal ini menunjukkan bahwa α -Tokoferol mampu melindungi sel dari bahaya etanol, dengan ditandai banyaknya sel yang hidup (*viabel*) pada kultur sel primer ginjal setelah di uji viabilitas menggunakan tripan biru 0,4%.

Tripan biru digunakan untuk uji viabilitas karena merupakan pewarna sel secara sederhana. Bolt (2001) menjelaskan bahwa tripan biru tidak mengubah integritas membran plasma dan memperlambat proses kematian sel, dan juga memperkecil jumlah sel dan memfasilitasi identifikasi sel yang akan dilihat dengan mikroskop.

Setelah 4 hari masa inkubasi medium pertumbuhan dikeluarkan dari *well*, kemudian sel dicuci dengan menggunakan PBS. PBS akan menghilangkan serum yang terkandung di dalam medium. Serum harus dihilangkan agar tidak mengganggu kerja tripsin. Setelah sel dicuci dengan PBS, ditambahkan tripsin untuk melepas sel dari permukaan *well* dan lebih mudah melakukan perhitungan karena sel akan terpisah-pisah. Tripsin memiliki aktivitas proteolitik yang dapat menyebabkan kerusakan protein pada membran sel. Inkubasi suspensi tripsinisasi dilakukan selama 5-8 menit. Waktu inkubasi yang terlalu lama dapat menyebabkan kerusakan membran sel akibat degradasi membran protein oleh tripsin (Hsiang *dkk*, 2010).

Berdasarkan analisa statistika dengan menggunakan uji anava yang dilanjutkan uji BNT dengan tingkat signifikansi 1% dapat dilihat pada grafik 4.4 di bawah ini :

Gambar 4.4 Grafik rata-rata tentang pengaruh Vitamin E (α -Tokoferol) terhadap viabilitas sel yang dipapar etanol pada kultur primer ginjal hamster



Keterangan :

1. K+ (Biakan sel kultur tanpa pemberian Vitamin E, dan dipapar etanol 24 jam)
2. P1 (Biakan sel kultur yang telah diberi Vitamin E 25 μ M dan dipapar etanol 10 mM selama 24 jam)
3. P2 (Biakan sel kultur yang telah diberi Vitamin E 50 μ M dan dipapar etanol 10 mM selama 24 jam)
4. P3 (Biakan sel kultur yang telah diberi Vitamin E 75 μ M dan dipapar etanol 10 mM selama 24 jam)
5. P4 (Biakan sel kultur yang telah diberi Vitamin E 100 μ M dan dipapar etanol 10 mM selama 24 jam)
6. P5 (Biakan sel kultur yang telah diberi Vitamin E 125 μ M dan dipapar etanol 10 mM selama 24 jam)
7. K- (Biakan sel kultur yang tanpa diberi vitamin E dan etanol)

Hasil uji BNT 1% menunjukkan bahwa pemberian α -Tokoferol konsentrasi 25 dan 50 μ M tidak berbeda nyata dengan K(+). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian α -Tokoferol pada konsentrasi 25 dan 50 μ M belum memberi pengaruh pada viabilitas sel. α -Tokoferol mulai memberikan pengaruh berbeda pada konsentrasi 75 μ M, pada konsentrasi 100 dan 125 μ M α -Tokoferol memberikan hasil yang tidak berbeda dengan K(-) dan konsentrasi efektif pada penelitian ini adalah perlakuan 100 μ M.

Adanya pengaruh Vitamin E (α -Tokoferol) konsentrasi 75 μ M pada kultur primer sel ginjal Hamster yang dipapar Etanol, diduga karena pada konsentrasi tersebut α -Tokoferol mampu mempertahankan sel dari radikal yang dihasilkan oleh etanol. Konsentrasi tersebut sudah cukup dalam mengimbangi etanol 10 mM. Sareharto (2010) telah menjelaskan bahwa transport Vitamin E oleh PUFA menjamin perlindungan lipid terhadap radikal bebas, kadar tokoferol yang bersirkulasi cenderung sesuai dengan kadar total lipid dan kolesterol.

α -Tokoferol merupakan antioksidan non enzimatis yang mampu mempertahankan integritas membran sel. Cara yang dilakukan oleh α -Tokoferol 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).

Pada penelitian ini sel-sel yang viable terlihat ketika diberi pewarnaan tripan biru 0,4% yaitu sel berwarna bening (Gambar 4.5). Diduga membran sel tidak menyerap warna dan mampu menjaga integritas membran, membran sel yang viable ikatan rantai fosfolipid nya mampu berinteraksi dengan α -tokoferol. 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.

Etanol ($\text{CH}_3\text{-COOH}$) termasuk alkohol primer yang rantai C nya sedikit, ikatan rantainya mudah putus jika ada senyawa yang lebih kuat menariknya, sehingga etanol cenderung membentuk radikal jika melewati membran. Inilah

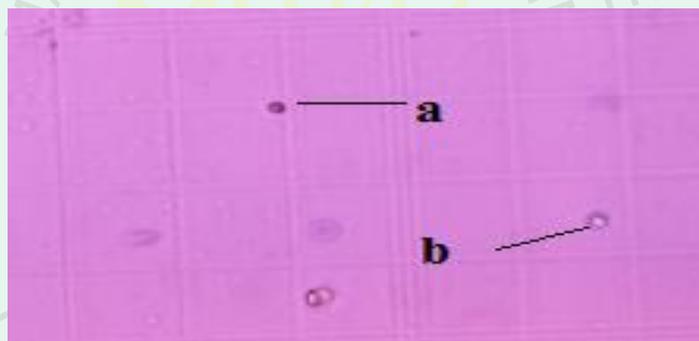
pemicu adanya peroksidasi lipid yang berujung pada kerapuhan membran. Menurut Masters (2002) gugus OH pada etanol sangat polar dan dapat membentuk ikatan hidrogen dengan sesama molekul alkohol, molekul netral dan dengan anion.

Radikal tersebut dapat distabilisasi dengan keberadaan α -tokoferol pada membran sel. α -Tokoferol mengurangi radikal bebas menjadi metabolit yang tidak berbahaya dengan mendonorkan ion hydrogen yang berada pada cincin chromanolnya. “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* (Combs, *et. al*, 1998; Sareharto, 2010)”.

Pada penelitian Sugiyama, *et.al.*(1989) α -Tokoferol pada konsentrasi 25 μ M mampu meningkatkan 50% pertumbuhan sel dan menurunkan penyerapan Sodium kromat (Na_2CrO_4) konsentrasi 10 μ M pada sel kultur hamster (C-79). Penelitian Warren, *et.,al* (2000) pemberian 50 μ M α -Tokoferol mampu meningkatkan sampai 80% viabilitas sel embrio tikus yang diinduksi cadmium (CdCl_2) 5 μ M. Sedangkan pada penelitian ini konsentrasi 25 μ M dan 50 μ M α -Tokoferol belum memberikan pengaruh berbeda dengan kontrol positif terhadap viabilitas sel yang telah dipapar etanol, hal ini diduga karena peroksidasi lipid pada membran yang ditimbulkan oleh paparan etanol 10 mM belum sepenuhnya

dapat dicegah dan diimbangi. Konsentrasi α -tokoferol yang rendah diduga belum bisa dimobilisasi pada membran sel sehingga menimbulkan proses oksidasi terhadap komponen-komponen sel yang penting dan terbentuknya hasil oksidasi yang toksik menyebabkan banyak sel-sel yang mati.

Sel-sel yang non viable (Mati) (Gambar 4.5) ditandai dengan sel yang menyerap warna dari tripan biru, hal ini diduga sel tersebut memiliki membran yang rapuh karena α -tokoferol belum mampu mempertahankan integritas membran. Etanol yang masuk melewati membran membentuk radikal yang reaktif menyebabkan stress oksidatif dan peroksidasi lipid. Membran sel menjadi rapuh dan mudah dilalui zat-zat ekstrasel termasuk tripan biru.



Gambar 4.5 Hasil pewarnaan tripan biru 0,4% (200x)

a. Sel yang mati terlihat terwarnai biru, b. Sel yang viable terlihat bening

Sel-sel yang mengalami kematian diduga berhubungan dengan meningkatnya ROS dalam membran sel. Etanol merusak membran sel dan menyebabkan senyawa rantai asam lemak membran terputus dan menjadi senyawa yang bersifat toksik di dalam sel antara lain aldehida, seperti malondialdehida (MDA) (Sareharto, 2010). Semakin banyak ROS yang dihasilkan akan meningkatkan MDA di dalam sel, MDA yang meningkat akan menurunkan rasio NAD^+/NADH dan meningkatnya ion Ca^{2+} dalam sel (Pospos, 2005).

Menurunnya rasio NAD^+/NADH , menyebabkan lemahnya fungsi mitokondria dan menghambat sintesis protein yang menyandi DNA mitokondria (Stanczyk, *et.al*, 2005) dan menurunkan produksi ATP (Pospos, 2005). Kadar ion kalsium yang tinggi intra sel dan transformasi dalam bentuk aktif dengan ikatan pada reseptor kalmodulin intra sel menyebabkan aktivasi enzim-enzim intraseluler tergantung kalmodulin seperti : fosfolipase, protein kinase dan endonuklease. Enzim – enzim tersebut merupakan pemicu dari berbagai rangkaian reaksi enzimatik, mengakibatkan kerusakan biomakromolekuler dan akhirnya menyebabkan kematian sel (Kustilowati, 2003).

4.4 Pengaruh Vitamin E (α -tokoferol) terhadap abnormalitas sel yang dipapar etanol pada kultur primer ginjal hamster

Pada penelitian ini sel-sel dibedakan menjadi sel mati dan sel hidup. Sel yang hidup dibedakan lagi antara sel sehat (normal) dengan sel yang tidak sehat (abnormal). 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).

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis statistik dengan Anava tunggal tentang efek Vitamin E (α -Tokoferol) terhadap abnormal sel kultur primer ginjal hamster yang dipapar etanol diperoleh data yang menunjukkan bahwa F hitung > F table 1 %. Hal ini menunjukkan bahwa Vitamin E mampu menurunkan persentase sel-sel yang abnormal pada kelompok perlakuan dibanding dengan kontrol positif. Hasil uji Anava bisa dilihat pada table 4.3 dibawah ini:

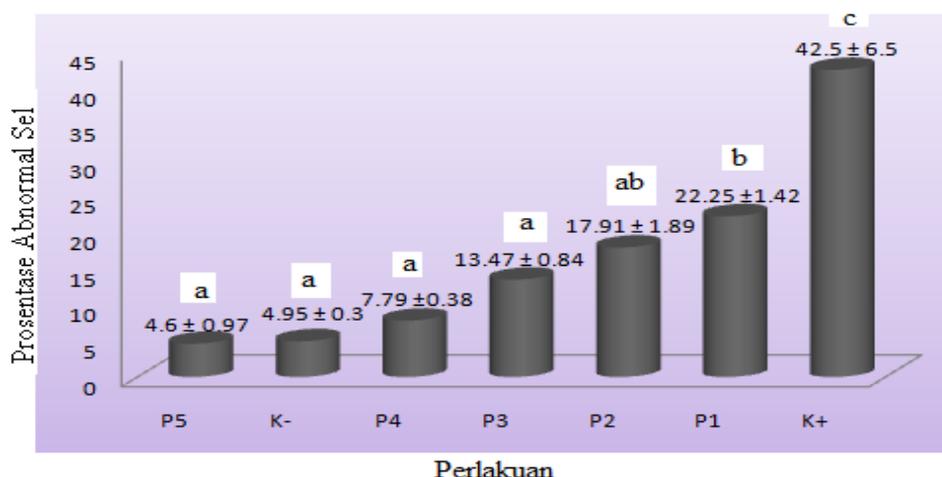
Tabel 4.3. Ringkasan anava tunggal tentang pengaruh Vitamin E (α -Tokoferol) terhadap abnormalitas sel yang dipapar etanol pada kultur primer ginjal hamster

SK	db	JK	KT	F hitung	F table 1%
Perlakuan	6	3212,11	535,35	75,28	4.46**
Galat	14	99,52	7,11		
Total	20	3310,5			

Keterangan **: Berbeda sangat nyata

Untuk mengetahui perlakuan pemberian vitamin E yang paling berpengaruh terhadap abnormalitas sel yang telah dipapar etanol, maka diuji lanjut dengan menggunakan uji beda nyata terkecil (BNT) 1%. Berdasarkan hasil uji BNT 0,01 dari rata-rata persentase abnormalitas sel didapatkan notasi BNT yang disajikan dalam gambar 4.6

Gambar 4.6 Grafik rata-rata tentang pengaruh Vitamin E (α -Tokoferol) terhadap abnormal sel yang dipapar etanol pada kultur primer ginjal hamster



Keterangan :

1. K+ (Biakan sel kultur tanpa pemberian Vitamin E, dan dipapar etanol 24 jam)
2. P1 (Biakan sel kultur yang telah diberi Vitamin E 25 μ M dan dipapar etanol 10 mM selama 24 jam)
3. P2 (Biakan sel kultur yang telah diberi Vitamin E 50 μ M dan dipapar etanol 10 mM selama 24 jam)
4. P3 (Biakan sel kultur yang telah diberi Vitamin E 75 μ M dan dipapar etanol 10 mM selama 24 jam)
5. P4 (Biakan sel kultur yang telah diberi Vitamin E 100 μ M dan dipapar etanol 10 mM selama 24 jam)
6. P5 (Biakan sel kultur yang telah diberi Vitamin E 125 μ M dan dipapar etanol 10 mM selama 24 jam.)
7. K- (Biakan sel kultur tanpa diberi vitamin E dan etanol)

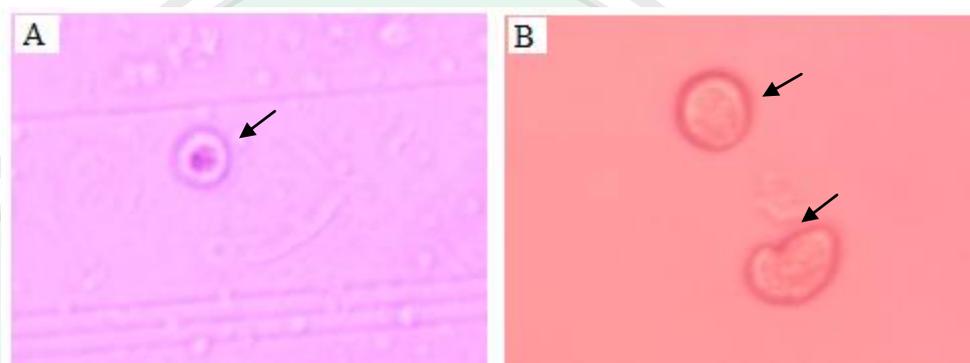
Berdasarkan gambar 4.6 tersebut bahwa rata-rata persentase abnormalitas pada perlakuan 25 μ M Vitamin E berbeda nyata dengan K+, hal ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi terendah pemberian vitamin E 25 μ M sudah mampu menurunkan persentase sel abnormal yang telah dipapar etanol. Pada perlakuan K- (tanpa penambahan vitamin E dan paparan etanol) tidak berbeda nyata dengan vitamin E 125 μ M, 100 μ M, dan 75 μ M tetapi berbeda dengan konsentrasi 50 μ M.

Menurunnya persentase abnormalitas sel pada konsentrasi 25 μ M vitamin E dari pada kontrol positif diduga Vitamin E pada konsentrasi tersebut sudah mampu mempertahankan kehidupan sel, karena vitamin E pada konsentrasi tersebut sudah dapat mengimbangi ROS pada membran sel. Selain melindungi membran sel Vitamin E juga akan masuk ke dalam sel melindungi membran organel mitokondria dan inti sel dari radikal bebas.

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 (Mahan, *et.,al*, 2004; Sareharto, 2010).

Berdasarkan hasil pengamatan ini sel-sel yang abnormal ditemukan dengan ciri-ciri sel yang volumenya besar, tidak seragam dengan sel-sel yang sehat. Dan sel tersebut besar dengan inti yang terwarnai oleh tripan biru (Gambar 4.7)



Gambar 4.7 Sel-sel hasil tripsinasi setelah perlakuan (perbesaran 200x) dengan mikroskop inverted, keterangan : A sel abnormal yang intinya terwarnai (piknotik), B. sel-sel volumenya besar inti sel hancur (Kariorekris)

Pada gambar 4.7 dapat dilihat sel-sel yang hidup tapi terlihat membengkak, membran plasma terlihat lebih gelap, ini merupakan gambaran abnormal sel. Penyebab pembengkakan sel tersebut karena membran sel rapuh akibat meningkatnya ROS dan menyebabkan zat-zat ekstrasel masuk tidak terkontrol. Menurut Nanji (2003) Peningkatan radikal bebas akibat pemberian alkohol akan mengaktifkan *nuclear factor* yang akan meningkatkan *tumor necrosis factor* (TNF alfa) yang berperan terhadap nekrosis.

Mekanisme terjadinya sel abnormal diduga karena ROS yang berada pada membran sel menyebabkan peroksidasi lipid dan kerusakan membran, sehingga membran kehilangan permeabilitas. radikal akan masuk ke dalam sel dan

menyerang organel-organel didalam sel yang memiliki komponen lipid, protein dan DNA seperti mitokondria dan inti sel. Hal inilah yang menyebabkan proses replikasi dan sintesis protein serta aktifitas organel-organel lain terganggu dan menyebabkan sel dalam keadaan abnormal.

Radikal bebas didalam sel menyebabkan 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 (Sareharto, 2010).

Radikal bebas 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).

Nekrosis merupakan kematian sel akibat respon patologis dan mengakibatkan peradangan jaringan. Nekrosis merupakan kematian sel yang tidak membutuhkan energy (ATP), yang terlihat sebagai pembekakan pada mitokondria dan retikulum endoplasma, yang menyebabkan volume sel bertambah, kerusakan fungsi di membran hingga terlepasnya materi seluler dan disertai respon inflamasi. Inflamasi terjadi pada kondisi patologis yang diaktifkan oleh makrofag (Halliwell, 1994).

Pada gambar 4.7 A sel terlihat sangat besar, melebihi sel-sel yang normal, sel juga terlihat berinti yang terwarnai dengan jelas, berdasarkan ciri tersebut abnormal ini berada pada tahap piknotik. Sedangkan pada gambar 4.7 B sel terlihat sangat besar dan tidak terlihat inti selnya, hal ini diduga kemungkinan inti selnya hancur, ciri abnormal sel ini termasuk pada tahap karioreksis. Hasil pengamatan tersebut sesuai dengan apa yang diungkapkan oleh Mufarichah (2011) bahwa perubahan pada sel yang nekrotik terjadi pada sitoplasma dan organel-organel sel lainnya. Inti sel yang mati akan menyusut (*piknotik*), menjadi padat, batasnya tidak teratur dan berwarna gelap. Selanjutnya inti sel hancur dan meninggalkan pecahan-pecahan zat kromatin yang tersebar di dalam sel. Proses ini disebut *karioreksis*. Kemudian inti sel yang mati akan menghilang (*kariolisis*).

4.5 Kajian Keislaman Terkait Hasil Penelitian

Kesehatan merupakan permasalahan yang penting dalam kehidupan. Tanpa adanya tubuh yang sehat, maka berbagai macam aktivitas sehari-hari dapat terganggu. Pola hidup yang tidak sehat sekarang ini banyak dilakukan oleh masyarakat seperti mengkonsumsi alkohol semata-mata bertujuan untuk menghilangkan rasa capek, masalah dan sebagainya. Konsumsi alkohol yang berlebihan menyebabkan gangguan sistem saraf, melemahnya daya kerja jantung dan organ-organ tubuh lainnya, menimbulkan penyakit hepar dan degeneratif lainnya termasuk penyakit kanker.

Sesungguhnya secara tersirat Allah telah menjelaskan didalam al-Quran tentang bahaya yang ditimbulkan oleh alkohol. Firman Allah dalam surat al-Maidah ayat 90 :

يَتَأْتِيهَا الَّذِينَ ءَامَنُوا إِنَّمَا الْحَمْرُ وَالْمَيْسِرُ وَالْأَنْصَابُ وَالْأَزْلَامُ رِجْسٌ مِّنْ عَمَلِ الشَّيْطَانِ
فَاجْتَنِبُوهُ لَعَلَّكُمْ تُفْلِحُونَ ﴿٤٣٤﴾

”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”.

Ayat tersebut menjelaskan larangan meminum khamer yang lazim dikenal dengan alkohol. Allah memerintahkan menjauhi khamer karna sesungguhnya zat terkandung dalam khamer (etanol) dapat menyebabkan berbagai jenis penyakit.

Larangan Allah terhadap alkohol karena berbahaya terhadap kesehatan tubuh, menyebabkan beberapa organ yang penting dalam tubuh diantaranya hepar, ginjal dan otak menjadi rusak. Kesatuan organ disusun oleh sistem organ, sistem organ disusun oleh kumpulan beberapa jaringan, jaringan disusun oleh sel-sel yang berfungsi secara bersama-sama. Alkohol akan menyerang unit terkecil susunan makhluk hidup yaitu sel. Menurut Miller dan Mark (1981) bahwa alkohol yang dikonsumsi akan benar-benar mencapai dalam sel, karena alkohol memiliki gugus polar OH yang larut dalam senyawa organik.

Alkohol berbahaya karena kandungan terbesarnya adalah etanol. Etanol memiliki gugus R— yang hidrofobik dan –OH yang hidrofilik, sehingga etanol bersifat polar. Berdasarkan hasil penelitian ini bahwa etanol konsentrasi 10 mM yang dipaparkan pada kultur sel primer ginjal menyebabkan kerusakan sel, menurunkan viabilitas dan meningkatkan abnormal sel.

Mekanisme terjadinya kerusakan sel, penurunan viabilitas sel dan meningkatnya abnormal sel secara umum dipicu oleh radikal bebas yang ditimbulkan etanol dalam membran sel. Radikal bebas merupakan salah satu

bentuk senyawa oksigen reaktif, yang diketahui sebagai senyawa yang memiliki elektron yang tidak berpasangan (Winarti, 2007). Radikal bebas mempunyai sifat reaktifitas tinggi, karena kecenderungan menarik elektron, serta dapat mengubah suatu molekul menjadi suatu radikal baru lagi sehingga terjadi reaksi rantai (*chain reaction*) dan bersifat merusak.

Radikal bebas yang ditimbulkan oleh etanol pada membran akan merusak komponen-komponen membran sel seperti fosfolipid, glikolipid, protein dan kolesterol, komponen tersebut merupakan komponen utama penyusun membran. Membran sel memiliki fungsi mengontrol masuknya nutrisi dan keluarnya hasil metabolisme, membran sel juga menjaga perbedaan konsentrasi ion di dalam dan di luar sel, serta sebagai sensor untuk sinyal-sinyal diluar maupun didalam sel. Ketika membran sel tersebut rusak karena diserang oleh radikal bebas dari etanol, maka membran akan kehilangan fungsi-fungsinya, dan menyebabkan sel rusak dan mati.

Sesungguhnya gambaran mekanisme radikal bebas dalam merusak komponen-komponen sel secara umum telah diterangkan dalam hadis Rasulullah SAW yang berbunyi :

قَالَ رَسُولُ اللَّهِ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ: كَادَ الْفَقْرُ أَنْ يَكُونَ كُفْرًا.

Rosulullah SAW bersabda: adanya kefakiran bisa menyebabkan kekufuran

Dalam hadis tersebut dikatakan bahwa kefakiran bisa menyebabkan suatu kekufuran, jika diintegrasikan dengan hasil penelitian ini, bahwa adanya elektron yang tidak berpasangan dalam membran sel akibat terserang radikal dari etanol bisa menyebabkan kerusakan, kematian dan abnormal pada sel.

Radikal dalam membran sel akan menyebabkan timbulnya ROS pada membran dan peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid bisa menyebabkan kerusakan membran sel, sehingga interaksi sel baik secara fisik yaitu hubungan sel dengan sel yang difasilitasi oleh protein chaderin yang berikatan dengan protein chaderin , dan hubungan sel dengan matriks yang difasilitasi oleh protein membran sel yang disebut integrin yang berinteraksi dengan matriks ekstra selluler seperti fibrin. Serta interaksi kimiawi yaitu sebagai penyampai signal menjadi terganggu.

Para ahli kesehatan telah menciptakan banyak obat atau suplemen untuk mencegah tubuh terjangkit berbagai penyakit. Seiring berkembangnya zaman, berkembang berbagai jenis penyakit yang lebih berbahaya. Allah telah memerintahkan kepada kita untuk memakan makanan yang halal dan baik untuk mencegah terjadinya penyakit, di dalam surat Al-Baqoroh ayat 168 telah dijelaskan :

يَأْتِيهَا النَّاسُ كُلُّوْا مِمَّا فِي الْأَرْضِ حَلَالًا طَيِّبًا وَلَا تَتَّبِعُوا خُطُوَاتِ 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).

Persyaratan makanan yang baik (*thayyib*) menurut ilmu gizi adalah makanan yang dapat memenuhi fungsi-fungsi bagi tubuh yakni makanan yang mengandung karbohidrat, protein dan vitamin. 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.

Allah SWT juga menyebutkan *وَلَا تَتَّبِعُوا خُطُوَاتِ الشَّيْطَانِ* yang artinya janganlah kamu mengikuti langkah-langkah syaitan, yang dimaksud langkah syaitan disini adalah melanggar perintah Allah dengan memakan makanan yang menyebabkan suatu penyakit, seperti meminum alkohol yang bahayanya sudah jelas terhadap kesehatan.

Di Negara-negara maju sudah ada terapi antioksidan untuk mencegah timbulnya penyakit, tetapi hal tersebut belum sepenuhnya diterapkan. Oleh karena itu dibutuhkan berbagai jenis antioksidan untuk terapi kesehatan. Salah satu jenis antioksidan yang berfungsi sebagai pemelihara keseimbangan intraselluler adalah vitamin E (Alava *dkk.*, 1993). Vitamin E dapat mencegah terjadinya radikal bebas dan memutus ikatan berantai pada membran sel dengan mendonorkan atom H pada cincin chromanolnya, sehingga Vitamin E dapat menjaga kestabilan membran, dan mencegah terjadinya kerusakan sel dan abnormal sel.

Langkah-langkah dalam mencegah suatu penyakit yakni dengan mengkonsumsi antioksidan merupakan manifestasi dari prinsip Islam dalam menjaga kesehatan fisik yaitu:

الْوَقَايَةُ خَيْرٌ مِنَ الْعَلَّاجِ
“Pencegahan lebih baik daripada pengobatan”

Hasil Penelitian ini memberikan pelajaran penting akan konsep pencegahan. Setiap suplemen memiliki aturan dosis atau konsentrasi tertentu sehingga tidak sampai toksik terhadap sel. Allah berfirman dalam surat al-Qomar ayat 49 :

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ ﴿٤٩﴾

”Sesungguhnya Kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran.”

Pentingnya ukuran dosis atau konsentrasi pada penelitian ini dikorelasikan dengan ayat tersebut. Berdasarkan hasil penelitian dapat dilihat bahwa pada konsentrasi 75 μM Vitamin E (α -Tokoferol) mampu mempertahankan viabilitas sel, pada konsentrasi 50 μM menurunkan persentase kerusakan biakan sel, dan pada konsentrasi terendah yakni 25 μM Vitamin E (α -Tokoferol) mampu menurunkan persentase sel abnormal pada kultur primer ginjal hamster yang dipapar etanol. Ketepatan ukuran, dalam hal ini konsentrasi pemberian Vitamin E sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan dan perkembangan sel dalam lingkungannya. Pertumbuhan dan perkembangan merupakan salah satu parameter kesehatan tubuh.

Hasil penelitian ini telah memberikan pelajaran yang penting jika kita senantiasa berfikir akan kebesaran Allah. Firman Allah dalam surat ali-Imran ayat 190-191 :

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَأَخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لآيَاتٍ لِأُولِي الْأَلْبَابِ ﴿١٩٠﴾
 الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا
 مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطْلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ﴿١٩١﴾

“ Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal,191. (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): "Ya Tuhan kami, tiadalah Engkau menciptakan Ini dengan sia-sia, Maha Suci Engkau, Maka peliharalah kami dari siksa neraka.”

Ayat tersebut menunjukkan bahwa dalam penciptaan langit dan bumi serta sesuatu yang ada di dalamnya, termasuk dalam pergantian siang dan malam, keteraturan yang ada di dalamnya menunjukkan keesaan Allah dan kesempurnaan kehendakNya. Manusia sebagai makhluk yang diberi kelebihan akal (*ulul albab*) diperintahkan oleh Allah untuk mengkaji/meneliti apa yang telah diciptakanNya, karena segala sesuatu yang ada di langit dan di bumi ini tidak ada hasil ciptaanNya yang sia-sia.

