

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Dalam tubuh manusia terpapar beribu-ribu xenobiotik mengingat senyawa asing yang diketahui manusia berjumlah lebih dari 100.000 macam. Manusia secara sengaja mengkonsumsi xenobiotik seperti bahan pengawet, penyedap rasa, obat-obatan dan asap rokok. Secara terus menerus tanpa disadari manusia terpapar xenobiotik yang ada di lingkungan. Formalin merupakan salah satu xenobiotik yang sekarang ini banyak ditemukan dalam industri makanan sebagai pengawet. Seringkali penggunaannya tidak diketahui kadarnya sebab tidak terdaftar dan tidak terpantau oleh Depkes dan balai POM setempat. Pemeriksaan yang dilakukan oleh Badan Pemeriksa Obat dan Makanan (BPOM) menunjukkan ada beberapa makanan yang mengandung formalin seperti mie basah, bakso, ikan asin dan tahu. ^(1, 2,3)

Formalin merupakan larutan yang tidak berwarna dan baunya sangat menusuk. Di dalam formalin terkandung sekitar 37 persen formaldehid dalam air, sebagai bahan pengawet biasanya ditambahkan metanol hingga 15 persen. Terdapat 4 rute paparan terhadap formaldehid, yaitu melalui inhalasi, ingesti, kulit dan mata. Paparan formaldehid di dalam tubuh akan dimetabolisme dengan cepat baik secara inhalasi maupun ingesti, namun sedikit lamban bila melalui paparan kulit maupun mata. ^(2,4,5)

Apabila xenobiotik masuk ke tubuh manusia, tubuh mempunyai mekanisme metabolisme guna mengeliminasi senyawa tersebut. Formaldehid cepat dimetabolisme secara enzimatis menjadi asam format yang dikeluarkan

bersama urin. Asam format juga dioksidasi menjadi CO₂ untuk dikeluarkan melalui ekshalasi. ^(1, 5,6)

Ambang batas yang ditentukan oleh American Conference of Governmental and industrial Hygienist (ACGIH) yaitu 0,4 ppm, National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) yaitu 0,016 ppm selama periode 8 jam dan 0,1 ppm selama periode 15 menit, International Programme on Chemical safety (IPCS) yaitu 0,1 mg/liter atau 0,2 mg/hr dalam air minum dan 1,5 mg – 14 mg perhari dalam makanan. ^(8,9)

Jika formaldehide yang masuk dalam tubuh melampaui ambang toxic , akan bereaksi ke hampir semua zat di dalam sel dan menekan fungsi sel kemudian menyebabkan kematian sel dan akhirnya dapat menyebabkan kerusakan pada organ tubuh. Formaldehide yang tidak termetabolisme dapat bereaksi dengan tetrahidrofolate dan memperlambat metabolisme single atom karbon. Atom karbon yang dihasilkan merupakan elektrofilik dan dapat bereaksi kuat terhadap makromolekul , termasuk DNA dan protein, juga bereaksi kuat terhadap nukleofilik membran sel yang akan menyebabkan meningkatnya produksi senyawa *reactive oxygen species* (ROS) dalam tubuh. Keadaan tersebut dapat menyebabkan terjadinya stres oksidatif. Stres oksidatif dapat menyebabkan terjadinya reaksi peroksidasi lipid membran , oksidasi protein termasuk enzim dan DNA, yang dapat menyebabkan terjadinya kerusakan oksidatif dan karsinogenesis. ^(5,6,7,8,10, 11)

Toksisitas formaldehide dapat menyebabkan kerusakan oksidatif pada jaringan tubuh . Menurut penelitian Ku dan Billings , paparan formaldehid mengakibatkan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) , dan lipid

peroksidasi, sehingga menyebabkan stres oksidatif di hepar, plasma, limfosit, jantung, dan otak.⁽⁷⁾ Gurel et al meneliti perubahan biokimia dan histopatologi pada jaringan otak tikus wistar yang diinduksi. Pada penelitian ini terjadi penurunan kadar SOD dan katalase, serta kenaikan level karbon protein. Masih pada penelitian ini tikus yang diinduksi formalin dan antioksidan vitamin E menunjukkan sifat protektif pada indikator biokimia tersebut. Peneliti menyimpulkan formaldehid menyebabkan kerusakan oksidatif pada otak yang diperantarai radikal bebas.⁽⁷⁾ Penelitian Chanif Mahdi (2007) menyebutkan tikus yang diberi larutan formalin 100 ppm selama 1 minggu akan menyebabkan terjadinya kerusakan membran sel yang ditandai dengan peningkatan MDA dan perubahan morfologi jaringan hepar yang dinilai dari pemeriksaan histopatologi. Masih menurut Chanif Mahdi, radikal bebas yang dihasilkan dari formaldehid, terutama radikal hidroksil (OH⁻) menyebabkan terjadinya peroksidasi asam lemak tak jenuh pada membran sel, sehingga terjadi kerusakan oksidatif sel hepar.⁽⁵⁾

Hepar merupakan organ yang memiliki kapasitas metabolik tertinggi di banding organ lain. Xenobiotik yang masuk dalam tubuh manusia, diantaranya formalin, akan mengalami berbagai reaksi metabolisme guna proses eliminasi bahan berbahaya tersebut. Reaksi tersebut meliputi reaksi non sintetik yaitu reaksi oksidasi, reduksi dan hidrolisis; dan reaksi sintetik yaitu reaksi konjugasi. Oleh karena kapasitas metabolik terbesar ada di dalam hepar, dengan sendirinya kapasitas aktivasi xenobiotik formalin paling tinggi juga terjadi di dalam hepar. Organ yang memiliki aktivitas metabolisme yang tinggi akan rentan mengalami kerusakan. Hal ini dikarenakan sangat banyak xenobiotik yang menjadi toksik yang membutuhkan aktivasi metabolik.^(13,36)

Sel hepar yang mengalami stress seluler dapat dideteksi dengan pemeriksaan immunohistokimia melalui ekspresi protein p53. Protein p53 dihasilkan dalam sel sebagai monitor sinyal biokimia yang dapat mengindikasikan kerusakan DNA dan mutasi DNA. Pada keadaan normal protein ini berjumlah sedikit dalam sel, namun bila ada kerusakan DNA atau stress seluler dapat menyebabkan peningkatan protein p53, yang kemudian p53 berfungsi menahan sel untuk melanjutkan siklus sel, memberikan waktu kepada DNA untuk melakukan repair, penghentian siklus sel/ arrest (G0), atau perintah kematian sel apoptosis. ⁽²⁸⁾ Ekspresi p53 sering digunakan sebagai indikator kerusakan dan kematian sel dalam berbagai penelitian.

Kulit manggis atau *Garcinia Mangostana* Linn (GML) adalah salah satu tanaman tropis asli Indonesia yang berasal dari Kalimantan. Pemanfaatan ekstrak kulit manggis sudah banyak digunakan di masyarakat terutama di Thailand, sebagai pengobatan infeksi luka (Pierce 2003) , disenti amuba (Garnett Sturton 1932), antiinflamasi ⁽¹⁵⁾

Penelitian fitokimia dari tanaman ini telah mengungkap kandungan xanton yang telah menunjukkan berbagai bioaktivitas , antara lain antiinflamasi, antibakterial, antifungal, antitumor dan antioksidan. Xanton dari GML merupakan sumber antioksidan alamiah yang berfungsi menurunkan senyawa oksigen reaktif. Senyawa xanton yang telah teridentifikasi, diantaranya adalah 1,3,6-trihidroksi-7-metoksi-2,8-bis(3- metil-2-butenil)- 9H-xanten-9-on and 1,3,6,7- tetrahidroksi-2,8-bis(3-metil-2-butenil)- 9Hxanten- 9-on. Keduanya lebih dikenal dengan nama alfa mangostin dan gamma-mangostin. ^(20, 21)

Kulit buah manggis telah diteliti mengandung polifenol / senyawa fenolik yang merupakan antioksidan alami. Senyawa fenolik adalah senyawa organik yang memiliki minimal satu cincin aromatik dengan satu atau lebih gugus hidroksil. Senyawa fenolik dapat berfungsi sebagai antioksidan karena kemampuannya dalam menstabilkan radikal bebas, yaitu dengan memberikan atom hidrogen secara cepat kepada radikal bebas. Dengan sifatnya tersebut, senyawa fenolik ini dapat melindungi sel dari kerusakan oksidatif. ⁽¹⁹⁾

Penelitian terhadap aktivitas ekstrak GML menunjukkan adanya aktivitas antiradikal terhadap DPPH, sedangkan alfa dan gamma mangostin pada kulit buah manggis menggunakan metode *ferric thiocyanate* juga menunjukkan aktivitas antioksidan. ⁽²⁰⁾ Dengan pemeriksaan spirometry kulit manggis menunjukkan aktifitas scavenging gugus radikal hidroksil dan radikal superoksida ⁽¹⁹⁾.

Aktivitas antioksidan ekstrak fenolik dari kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.) menunjukkan bahwa ekstrak kulit buah manggis memiliki kandungan total fenolik dan aktivitas antioksidan yang besar, dengan kandungan total fenolik dan aktivitas antioksidan tertinggi pada ekstrak metanol sampel kering, diikuti ekstrak metanol sampel basah, ekstrak air sampel kering dan ekstrak air sampel basah. ⁽¹⁸⁾ Ika Kustiyah (2012) meneliti ekstrak kulit manggis dosis 200mg/kgBB dan 400mg/kgBB memberikan efek perbaikan pada ulkus lambung selama 1minggu. ⁽²¹⁾.

Berdasarkan uraian di atas maka muncul pertanyaan dan perlu diteliti lebih lanjut apakah kulit manggis yang memiliki aktifitas antioksidan tersebut mampu mengeliminasi oksidatif stress / kerusakan oksidatif yang dihasilkan dari paparan formalin. Pada penelitian ini tikus diinduksi oleh formalin, kemudian diberikan

kulit manggis. Kulit manggis dibuat ekstrak kering murni tanpa pengambilan unsur tertentu karena lebih murah dan mudah diaplikasikan di dalam masyarakat dan kehidupan sehari-hari. Pemberian kulit manggis yang mempunyai efek antioksidan diharapkan dapat memperbaiki kerusakan sel yang diakibatkan kerusakan oksidatif formalin. Kerusakan akibat oksidatif stress tersebut dapat dinilai dengan menghitung jumlah kematian sel hepar pada pemeriksaan histopatologi dan memeriksa ekspresi p53 yang dilakukan dengan pemeriksaan immunohistokimia jaringan hepar. Ekspresi protein p53 merupakan indikator kerusakan sel dan kematian sel.^(28,30,31) Kulit manggis diberikan dengan dosis bertingkat untuk melihat tingkat keefektifannya dalam memperbaiki kerusakan sel hepar.

Penelitian dilakukan menggunakan hewan coba tikus wistar yang kelak kemudian hari bisa meningkat dilakukan pada manusia. Tikus wistar sering digunakan sebagai binatang percobaan dalam penelitian untuk mengetahui efek suatu zat terhadap tubuh.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut di atas, maka rumusan masalah pada penelitian ini: Apakah berpengaruh pemberian ekstrak kulit manggis (*Garcinia Mangostana Linn*) terhadap ekspresi p53 sel hepar dan jumlah kematian sel hepar pada tikus wistar yang diinduksi formalin.

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan pengaruh pemberian ekstrak kulit manggis terhadap ekspresi protein p53 sel hepar dan jumlah kematian sel hepar pada tikus wistar yang diinduksi larutan formalin.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Membuktikan pengaruh pemberian ekstrak kulit manggis terhadap ekspresi protein p53 sel hepar pada tikus wistar yang diinduksi larutan formalin.
2. Membuktikan pengaruh pemberian ekstrak kulit manggis terhadap jumlah kematian sel hepar pada tikus wistar yang diinduksi larutan formalin.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat ilmu pengetahuan

Dalam pengembangan ilmu pengetahuan, penelitian ini diharapkan mampu menjelaskan mekanisme pencegahan kerusakan oksidatif jaringan akibat paparan larutan formalin melalui mekanisme antioksidan kulit buah manggis.

1.4.2 Manfaat klinis

Dalam aplikasi klinis, penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar penemuan obat herbal yang bersifat antioksidan, sehingga dapat diaplikasikan pada manusia untuk penyembuhan ataupun pencegahan kerusakan jaringan akibat radikal bebas.

1.4.3 Manfaat institusi

Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat sebagai bahan pengajaran terutama di bidang ilmu biomolekuler.

1.5 Orisinalitas

Penelitian mengenai efek formalin dan kulit manggis pada hewan coba sudah pernah dilakukan oleh peneliti lain sebelumnya seperti yang tertera pada tabel dibawah ini.

Tabel 1. Penelitian tentang efek toksik formalin dan kulit manggis

No	Judul	Nama peneliti	Metodologi	Hasil
1.	Perbedaan jumlah nekrosis sel otak dan nilai ph darah tikus wistar pada pemberian formalin peroral dosis bertingkat,	Rohmah IN, 2012	24 ekor tikus wistar diberi formalin dalam dosis bertingkat yaitu 0,03; 0,07; 0,15 ml/hari selama 3 bulan. Dinilai jumlah nekrosis sel otak dan nilai pH darah.	Terdapat perbedaan yang bermakna jumlah nekrosis sel otak dengan $p=0,041$. Tidak terdapat perbedaan bermakna nilai pH darah dengan $p=0,814$
2.	Yogurt Sebagai Detoksikan yang Efektif Terhadap Toksisitas Formalin yang Terpapar dalam Makanan	Chanif Mahdi, 2007	50 tikus dibagi menjadi 2 kelompok. Kelompok 1 tikus di berikan paparan formaldehide 0ppm, 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm dan secara bersamaan diberi minuman yogurt 2 ml setiap hari selama 1 minggu. Kelompok 2 tanpa diberi yogurt.	Terdapat peningkatan kadar MDA jaringan hepar pada paparan formaldehide tanpa diberi yogurt ($p<0,01$), dibanding dengan pada kelompok yang diberi yogurt.
3.	Efek ekstrak etanolik kulit buah manggis pada healing model ulkus lambung tikus wistar yang dipapar	Ika Kustiyah, 2012	Tikus dibuat ulkus lambung dengan pemberian indometasin kemudian diberi ekstrak kulit manggis dosis bertingkat, yaitu 200,400,800 mg/kgBB. Dinilai ekspresi VEGF	Terdapat peningkatan ekspresi VEGF dan CD31 serta produksi NO, yang membuktikan adanya efek angiogenesis pada kulit manggis.

	indometasin, melalui efek anti-inflamasi dan angiogenesis		dan CD31 dengan pemeriksaan histopatologi dan imunohistokimia. Dinilai juga kadar NO, TNFalfa, IL1 pada jaringan lambung.	Terdapat penurunan IL1 dan TNFalfa yang membuktikan adanya efek angiogenesis pada kulit manggis.
4.	The alpha mangosteen derived pericarp mangosteen prevention on cisplatin-induced apoptotic death in LLC-PK1 cells is associated to an inhibition of ROS production and p53 induction,	Sánchez-Pérez Y, Morales-Bárceñas R, García-Cuellar CM, López-Marure R, Calderon-Oliver M, Pedraza-Chaverri J,	Sel epitel tubulus ginjal yang diinkubasi dengan alpha mangosteen dan diinduksi 100 microM cisplatin selama 24 jam.	Terdapat penurunan ekspresi p53 dan penurunan ROS

Penelitian ini berbeda dengan penelitian yang telah ada sebelumnya baik dari segi organ yang diperiksa, dosis, cara pemberian formalin, cara pemberian ekstrak kulit manggis maupun pemeriksaan imunohistokimia ekspresi p53 jaringan.

Penelitian ini digunakan tikus wistar jantan, pemberian ekstrak kulit manggis diberikan per oral setelah diberikan formalin yang dicampur minuman secara *ad libitum* sebelumnya. Penelitian ini difokuskan terhadap ekspresi p53 sebagai indikator morfologi kerusakan seluler serta menganalisa perubahan gambaran histopatologi jaringan tikus wistar pada pemberian ekstrak kulit manggis dosis bertingkat selama 1 minggu.