

BAB II

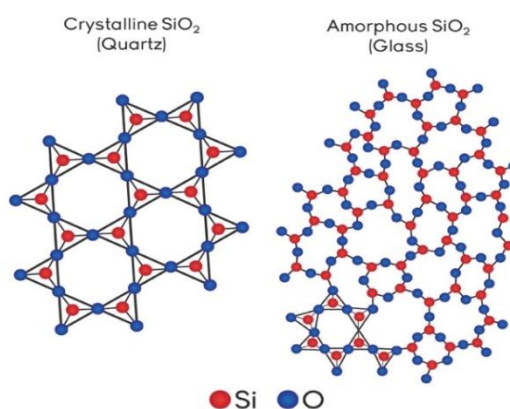
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pupuk Nanosilika

2.1.1 Silika

2.1.1.1 Definisi

Silika atau silikon dioksida memiliki rumus senyawa SiO_2 adalah senyawa yang terbentuk dari atom silikon dan oksigen. Karena oksigen adalah unsur yang paling melimpah di kulit bumi, sementara silikon adalah unsur di kulit bumi kedua terbanyak, maka bentuk silika merupakan bentuk yang sangat umum ditemukan di alam.²⁹ Silika memiliki struktur primer tetrahedral SiO_4 dimana satu atom silika dikelilingi oleh 4 atom oksigen. Gaya-gaya yang mengikat tetrahedral ini berasal dari ikatan ionik dan kovalen sehingga ikatan tetrahedral ini kuat.³⁰ Pada silika murni tidak terdapat ion logam dan setiap atom oksigen merupakan atom penghubung langsung antara dua atom silikon.



Gambar 1. Struktur Silika Jenis Kristalin dan Amorf.³¹

2.1.1.2 Klasifikasi

Silika secara umum terbagi menjadi bentuk kristalin dan amorf (non-kristalin). Perbedaan yang paling umum dari kedua jenis ini adalah bahwa kristalin silika merupakan bahan silika alamiah yang terdapat banyak di alam yaitu batuan bumi, abu vulkanik, pasir dan granit.⁷ Bentuk dari kristalin silika antara lain adalah bentuk kuarsa (quartz), kristobalit, dan tridymite. Silika jenis *kristalin* dalam bentuk debu apabila terhidup dapat menyebabkan silikosis, penyakit paru obstruktif kronis, fibrosis paru, tuberkulosis, bahkan kanker paru pada paparan kronik terutama pada pekerja konstruksi.^{11,19} Sedangkan, silika amorf dapat berasal dari bahan sintetik, alami di alam, dan produk sampingan. Silika amorf yang berasal dari alam contohnya terdapat pada tanah diatom (*diatomite*), *calcined*, dan *flux calcined*. Contoh jenis silika amorf yang tergolong bahan sampingan atau *by-products* adalah *fused silica* dan *silica fume*.

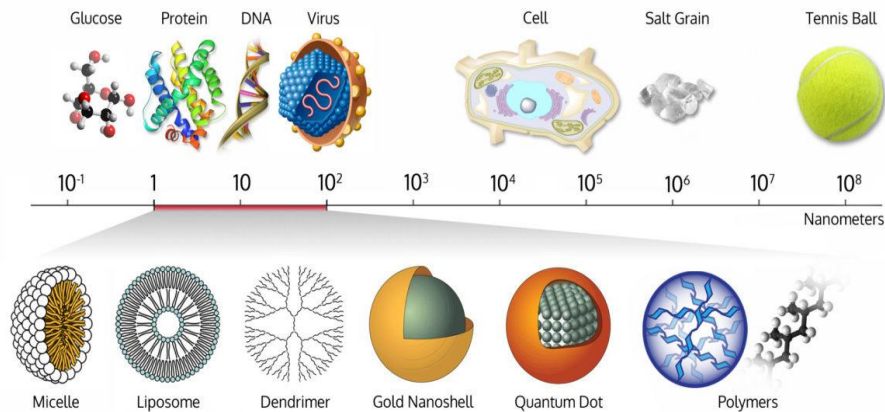
Jenis silika yang dimaksud di dalam penelitian ini secara umum merupakan jenis silika amorf sintetik atau lebih sering disebut dengan SAS (*Synthetic amorphous silica*), khususnya bentuk koloid. Silika amorf dibedakan melalui cara pembuatannya, yaitu melalui teknik *wet* dan *dry*. Pada teknik *wet* dihasilkan tipe silika amorf koloid, gel dan presipitat, sedangkan pada teknik *dry* atau *thermal* menghasilkan bentuk pirogenik silika. Jenis amorf ini adalah jenis silika yang paling banyak terakumulasi di dalam tubuh makhluk hidup, baik hewan atau tumbuhan. Silika amorf adalah material yang dihasilkan dari reaksi alkali-silika. Reaksi alkali-silika dimulai dengan pecahnya ikatan Si-O-Si dan hasilnya membentuk fase amorf dan nanokristal (Boinski, 2010). Silika amorf

juga dapat terbentuk ketika silikon teroksidasi secara termal. Silika amorf terdapat dalam beberapa bentuk yang tersusun dari partikel-partikel kecil yang kemungkinan ikut bergabung.³² Silika amorf sintetik dapat dibedakan dari jenis amorf lain dari tingkat kemurniannya yang sangat tinggi, bentuk partikelnya yang halus dengan pencitraan mikroskop elektron, dan dibedakan dengan jenis kristalin dari konektivitas unit tetrahedralnya. Pada silika amorf, molekul terdiri dari ikatan tetrahedral yang tidak berulang dimana semua sudut oksigen berhubungan dengan dua tetrahedral tetangga.³²

2.1.2 Nanopartikel

2.1.2.1 Definisi

Nanopartikel didefinisikan sebagai partikel dengan ukuran diameter dari 1 sampai 100 nm atau beberapa literatur mendefinisikan $<100 \text{ nm}$ (10^{-7} m) dalam sedikitnya satu dimensi. Gambar 2 memperlihatkan perbandingan ukuran antara molekul, virus, bakteri, sel kanker, dan bola tenis. Ukuran nanopartikel yang sangat kecil ini mempunyai keuntungan dan kerugiannya sendiri, di satu sisi paparan nanopartikel dapat berakibat bahaya terhadap kesehatan karena ukuran kecilnya memungkinkan interaksi unik dengan sel tubuh dan menyebar secara sistemik dibanding partikel dengan ukuran lebih besar, namun di sisi lain, berpotensi besar untuk dimodifikasi sifatnya menjadi partikel pembawa obat, alat diagnostik, dan terapi untuk sel target spesifik dalam tubuh.¹³



Gambar 2. Perbandingan Ukuran Nanopartikel.¹⁰

2.1.2.2 Sifat Fisikokimia Nanopartikel dan Hubungannya dengan Toksisitas

Dalam mengidentifikasi efek toksisitas nanopartikel tidak lepas dari karakteristik fisikokimia dari nanopartikel tersebut, mencakup antara lain ukuran, bentuk, muatan permukaan, properti kimia, struktur kristalin, solubilitas, porositas dan derajat agglomerasi. Sifat fisikokimia secara umum mempengaruhi biopersisten dari suatu partikel termasuk nanopartikel. Biopersisten didefinisikan sebagai lamanya waktu suatu partikel menetap di dalam kompartemen tubuh yang dihubungkan dengan faktor kimiawi partikel terhadap tubuh seperti kelarutan (solubilitas), potensi adsorpsi, dan juga faktor tubuh seperti respon jaringan dan *clearance* terhadap partikel yang bersangkutan.

Teori hubungan karakter fisikokimia khusus yang membedakan nanopartikel dengan partikel umumnya yang berukuran lebih besar, yaitu antara lain:

2.1.2.2.1 Bentuk Partikel

Dimana bentuk serat atau *fibers* memiliki potensi toksisitas lebih tinggi dari bentuk isometrik, dan bentuk kristal berfraksi runcing lebih poten menginduksi toksisitas dari partikel yang berbentuk bulat halus. Hubungan antara bentuk dan toksisitas nanopartikel juga sangat erat hubungannya dengan aspect ratio atau perbandingan antara panjang partikel dengan lebar/tebal nya.³³ Namun ada dua pendapat yang bertolak belakang berhubungan dengan toksisitas, *aspect ratio* yang tinggi dikorelasikan dengan produksi ROS yang lebih rendah dibandingkan dengan *aspect ratio* yang lebih rendah.³⁴ Namun, aspect ratio yang tinggi juga menyebabkan hambatan dalam internalisasi partikel saat endositosis yang menyebabkan penurunan fagositosis dari nanopartikel.³⁵

2.1.2.2.2 Ukuran

Dua poin penting yang perlu dipaparkan pada mobilitas nanopartikel dan interaksinya dalam tubuh adalah perbandingan ukuran nanopartikel dengan reseptor permukaan pada membran sel dan penurunan *uptake* dari makrofag pada partikel berukuran nano. Pada partikel berukuran lebih besar terjadi respon inflamasi yang persisten, sedangkan nanopartikel melalui penurunan *uptake* makrofag berakibat pada penurunan *clearance* dan respon inflamasi yang lebih ringan. Meskipun demikian, nanopartikel bebas yang menetap lebih lama dalam tubuh dapat berdampak terhadap sel target yang dimaksud melalui pelepasan radikal bebas, interaksi yang lebih lama dengan molekul endogenous (antioksidan, fosfolipid, dan reseptor membrane), dan pada akhirnya memiliki

kemungkinan lebih besar untuk mengalami endositosis dan translokasi (bermigrasi) ke sirkulasi darah sistemik.³³

Sebagai gambaran, apabila kita menginjeksikan nanopartikel ke dalam darah maka tidak akan mempengaruhi aliran darah di dalam pembuluh darah kapiler sekalipun, dan juga tidak akan menginduksi embolisasi. Di saat yang sama ukuran yang sangat kecil ini juga menguntungkan dalam hal efek erosi permukaan, adsorpsi dari ligan, endositosis dan ekstrasvasasi. Hal ini dikarenakan semua proses ini dipengaruhi oleh ukuran partikel dan semakin kecil ukurannya maka semakin cepat proses terjadi. Selain itu, efek ukurannya juga membuat nanopartikel memiliki stabilitas koloid apabila didispersikan.³³

2.1.2.2.3 Luas permukaan

Ukuran yang kecil akan meningkatkan luas permukaan per satuan berat/volume (meningkatkan rasio luas permukaan/volume). Aktivitas biologi partikel sangat dipengaruhi oleh luas permukaan yang berkontak langsung dengan cairan, jaringan atau molekul padat dalam tubuh yang menyebabkan respon tubuh seperti respon inflamasi dan pelepasan mediator sel. Hal ini menjadi penting untuk pertimbangan efek toksisitas nanopartikel dibandingkan dengan ukuran partikel yang lebih besar seperti mikropartikel dengan dosis/berat paparan yang sama, karena dengan berat yang sama nanopartikel dan mikropartikel memiliki luas permukaan yang berbeda. Perlu diidentifikasi apabila efek yang dihasilkan murni karena peningkatan toksisitas partikel atau karena efek luas permukaan yang meningkat.³³

Konsekuensi lain dari besarnya interaksi permukaan nanopartikel dalam tubuh adalah kemungkinan teradsorbsinya produk reaksi selular (indikator evaluasi aktivitas biologis) yang terjadi pada permukaan nanopartikel yang luas, sehingga mengganggu proses evaluasi. Contohnya, adsorpsi salah satu indikator sitotoksitas yaitu enzim laktat dehidrogenase (LDH) oleh nanopartikel *carbon black* yang membuat evaluasi efek sitotoksitas nanopartikel *carbon black* menjadi lebih rendah dari seharusnya.³³

2.1.2.2.4 Reaktivitas Permukaan/ Potensial Zeta

Peningkatan reaktivitas permukaan dihubungkan dengan posisi yang tidak stabil dari atom (elektron dan proton) atau ion di permukaan partikel, yang disebabkan oleh ruptur homolitik dari ikatan kovalen di permukaan partikel yang lebih sering terjadi pada partikel berukuran kecil. Di situs permukaan inilah sering terbentuk radikal bebas yaitu *Reactive Oxygen Species* (ROS). Karakter ini dipengaruhi oleh situs permukaan yang menghasilkan radikal bebas, ion logam yang tidak stabil, adsorpsi yang kuat dan modifikasi antioksidan atau protein endogenous yang dapat meningkatkan reaktivitas dan toksisitas secara umum.³³

Nanopartikel bermuatan tinggi cenderung stabil di media cair dikarenakan sifat tolak elektrostatisnya. Nanopartikel bermuatan positif tidak kompatibel dengan lingkungan biologis karena interaksi kuatnya dengan membran sel, protein serum, dan komplemen yang memfasilitasi endositosis oleh sistem retikuloendotelial. Sebagai perbandingan, nanopartikel bermuatan negatif juga dapat mengaktifkan komplemen, namun ikatan dengan membran sel dan protein serum lebih lemah sehingga memperpanjang waktu sirkulasi di dalam darah dan

penurunan filtrasi oleh glomerulus yang bermuatan anion juga akan memperlambat *clearance* lewat ginjal. Sedangkan, nanopartikel bermuatan netral memiliki komabilitas yang baik dengan lingkungan tubuh, dapat bertahan lama di sirkulasi darah, namun jika sudah beragregasi maka akan secara cepat di *uptake* oleh paru dan limpa.³⁵

Secara umum nanosilika termasuk partikel yang inert atau stabil, namun kehadiran grup pendonor proton (ion hidrogen) dari gugus silanol permukaannya cenderung memberikan sifat hidrofilik dan muatan negatif pada permukaannya apabila ion hidrogen terdisosiasi dalam air/cairan. Gugus bermuatan negatif ini dapat berinteraksi dengan cairan tubuh dan protein seperti membran lalu menyebabkan degradasi membran sel. Lebih lanjut, sifat hidrofilik dari gugus ini dapat mengadsorpsi makromolekul (protein, dll) dari lingkungan sekitar untuk melapisi permukaannya. Pada paru, nanosilika dapat mengadsorpsi cairan pelapis alveolus, termasuk protein dan surfaktan paru, sebelum berinteraksi dengan sel makrofag paru sehingga mempengaruhi toksisitasnya.³² Semakin hidrofobik suatu nanopartikel maka akan semakin mengganggu viabilitas sel dan menyebabkan kematian sel, namun nanopartikel yang hidrofobik lebih mudah diopsonisasi oleh makrofag sehingga lebih mudah mengalami fagositosis.³³

2.1.2.2.5 Reaktivitas Spesifik

Ada beberapa reaktivitas spesifik yang baru muncul pada partikel berukuran nano yang tidak ditemukan pada partikel berukuran lebih besar. Reaktivitas spesifik ini tidak berhubungan dengan peningkatan luas permukaan maupun reaktivitas permukaan, karena pada luas permukaan yang sama tidak

semua partikel menghasilkan reaktivitas spesifik ini. Reaktivitas spesifik ini hanya muncul apabila suatu partikel disintesis sedemikian rupa sehingga menjadi ukuran nano dan dalam ukuran nano muncul suatu sifat reaktivitas baru yang tidak dimiliki sebelumnya. Teori inilah yang mendasari pelapisan nanopartikel dengan substansi lain untuk mengurangi reaktivitas spesifik pada permukaannya.³³

2.1.2.2.6 Struktur Kimia Spesifik

Ada beberapa nanopartikel spesifik yang tidak memiliki ekuivalen partikel dengan ukuran lebih besar. Hal ini dikarenakan struktur kimia yang unik pada nanopartikel ini hanya dapat terbentuk pada ukuran nano dan tidak pada ukuran lebih besar, contohnya adalah *nanotube* karbon (*singlewall* maupun *multiwall*). Yang akibat strukturnya dikategorikan sebagai materi serat/*fibres* karena terbentuk dari filamen yang bergabung dan memiliki efek toksisitas mirip dengan asbestos. Namun fenomena demikian juga dipengaruhi oleh tingkat kemurnian dari partikel itu sendiri.³³

2.1.2.2.7 Ikatan Interpartikel

Semakin kecil partikel, semakin kuat ikatan interpartikel yang terjadi. Ikatan interpartikel menghasilkan agregasi dan lebih lanjut dapat menjadi aglomerasi. Agregasi terdiri dari ikatan yang kuat atau fusi dari partikel yang menghasilkan luas permukaan eksternal partikel yang beragregasi lebih kecil dari jumlah seluruh luas permukaan masing-masing partikel. Sedangkan aglomerasi adalah penggabungan dari partikel atau agregat dengan ikatan yang lemah, sehingga luas permukaan eksternal partikel yang beraglomerasi sama dengan jumlah seluruh luas permukaan masing-masing partikel. Kedua sifat ini dapat

membuat nanopartikel bergabung menjadi struktur yang lebih besar dan masuk ke dalam golongan struktur nanomaterial lalu kehilangan sifat nanopartikelnya. Sifat-sifat seperti muatan, hidrofobik, dan adsorpsi biomolekul menjadi sifat kunci dalam perubahan akibat agregasi dan aglomerasi ini.^{10,32,33}

Ikatan interpartikel dipengaruhi oleh media, nanopartikel yang sangat hidrofobik biasanya akan soliter di udara dan menggumpal di air. Hidrofobitas memegang peran besar di aglomerasi dalam air melalui “ikatan interpartikel hidrofobik”, salah satu cara untuk mengatasi aglomerasi nanopartikel adalah mengoksidasi ikatan ini sehingga terbentuk nanopartikel yang lebih hidrofilik. Agregasi dan aglomerasi dapat meningkatkan efek toksisitas dalam tubuh.^{10,33}

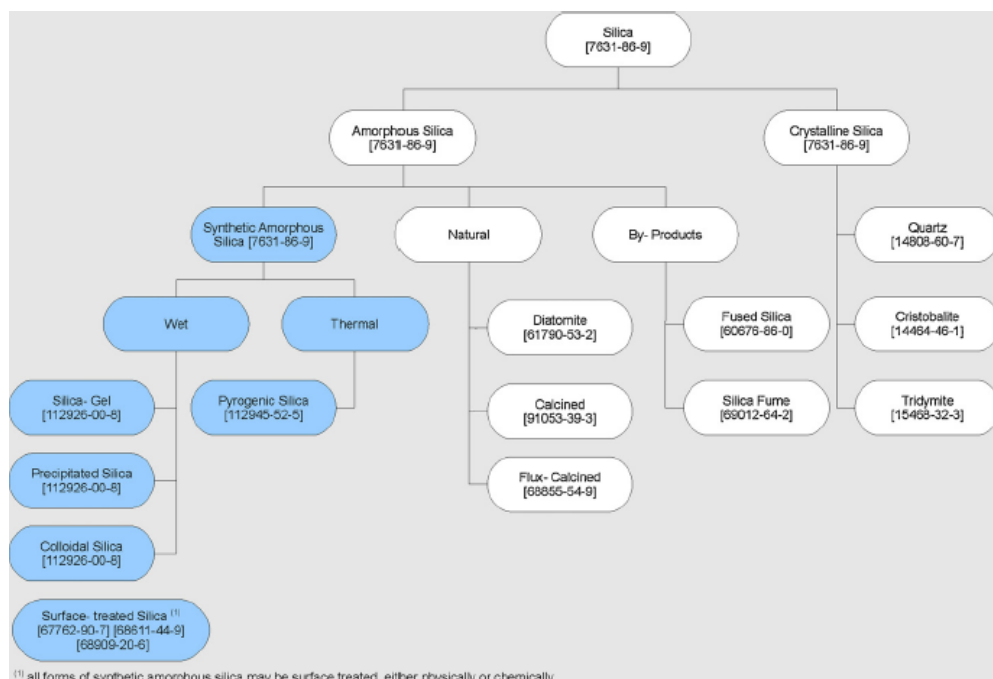
Nanosilika jenis koloid termasuk ke dalam jenis nanosilika yang cenderung sangat stabil dan terdispersi secara baik dalam media udara maupun cair, ini berarti nanosilika jenis koloid jarang mengalami agregasi atau aglomerasi. Ini berarti nanosilika koloid tidak membentuk gumpalan partikel namun terdiri dari monopartikel bebas yang terpisah satu sama lain, hal ini juga mungkin dapat disebabkan oleh muatan negatif pada permukaannya pada media cair yang menyebabkan adanya gaya dorong antar partikel yang kuat sehingga tidak menyatu.³²

2.1.2.3 Nanopartikel Silika/ Nanosilika

Nanopartikel silika atau lebih dikenal dengan nanosilika adalah bentuk partikel berukuran nano (<100nm atau 10^{-7} m) dari silika/ silikon dioksida

(SiO₂).¹¹ Nanosilika memiliki karakter yang unik dibandingkan dengan bentuk sediaan silika lain karena sifat fisis dan kimiawi nanosilika yaitu berukuran sangat kecil, sehingga meningkatkan rasio luas permukaan-volume, mudah dimodifikasi dalam hal stabilitas, kelarutan dalam air, reaktivitas permukaannya, dan memiliki biokompabilitas yang tinggi.^{11,12}

Nanosilika sudah diproduksi dengan skala besar sebagai bahan aditif dalam kosmetik, obat, makanan, produk agrikultural, resin, tinta, elektronik dan bahan industri lainnya.^{7,11,12} Berbagai penelitian menyatakan nanosilika merupakan agen yang potensial secara biomedis dan farmasi, yaitu dalam pengaplikasiannya untuk terapi kanker, agen pembawa obat, pemodifikasi/pembawa gen (DNA), agen immobilisasi enzim, biosensor bahkan pencitraan molecular.^{7,11,12,19,28}



Gambar 3 Klasifikasi Silika.³²

Secara umum klasifikasi nanosilika sama dengan klasifikasi silika pada umumnya, yaitu secara garis besar bentuk kristalin dan amorf, dimana nanosilika yang digunakan dalam percobaan ini berbentuk nanosilika amorf koloid. Untuk pemetaan lebih jelas klasifikasi nanosilika/silika dapat dilihat pada gambar 3.

2.1.3 Pupuk Nanosilika

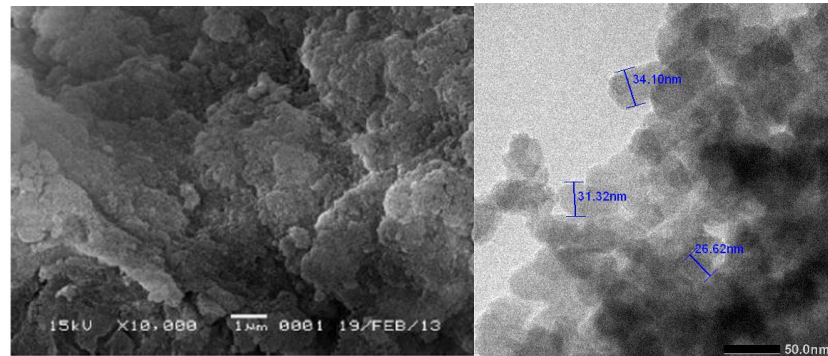
Peranan nanoteknologi dalam hal aplikasi material berukuran nanometer sangat pesat berkembang di bidang pertanian. Salah satu aplikasinya adalah digunakan dalam pembuatan pupuk nanosilika. Penggunaan pupuk nanosilika dalam bidang pertanian masih tergolong baru.³

Penggunaan pupuk nanosilika menjadi signifikan karena silika merupakan unsur hara yang sangat penting dalam menunjang kekuatan fisik dari tanaman, khususnya tanaman golongan *gramenae* (padi, tebu, jagung), yang merupakan jenis tanaman akumulator silika yang paling banyak ditanam oleh petani di Indonesia.⁴ Pemberian silika dilansir dapat mencegah kerobohan tanaman, meningkatkan ketahanan terhadap serangan hama, meningkatkan proses fotosintesis, penstabil zat hara dan menetralkan pH tanah.^{3,36} Partikel berukuran nano meningkatkan efektivitas penyerapan unsur silika tanaman dengan masuk secara langsung ke dalam stomata pada daun dan dapat diserap dengan mudah oleh membran sel - sel daun dengan teknik penyemprotan.^{3,36,37}

Pupuk silika biasa, contohnya jenis kalsium silikat, magnesium silikat dan kalium silikat bersifat basa, sehingga jika sering digunakan akan meningkatkan nilai pH tanah menjadi basa yang bisa berdampak pada turunnya produktivitas

tanaman. Sedangkan pupuk silika jenis silika gel, *fly ash* dan terak baja mempunyai kelemahan pada waktu penyerapan silika oleh tanaman tersebut. Hal ini karena pupuk silika jenis ini mengandung silika dengan ukuran partikel yang cukup besar, sehingga proses pemecahan/pelapukan partikel oleh lingkungan membutuhkan waktu yang cukup lama. Dibandingkan dengan jenis pupuk silika yang biasa, pupuk nanosilika memiliki beberapa keunggulan jika dimanfaatkan dengan cara menyemprotkan ke daun. Asumsi yang digunakan adalah bahwa mulut daun tanaman berukuran sekitar 10^{-6} meter (mikrometer) dan pada saat jam 07.00 sampai jam 12.00 akan membuka lebar oleh pengaruh paparan sinar matahari. Sedangkan partikel silika berukuran 10^{-9} meter (nanometer) sehingga dengan menambah sedikit bahan alami untuk menempelkan partikel nanosilika tersebut ke daun dan disemprotkan pada jam-jam tersebut maka akan memungkinkan peluang masuknya partikel nanosilika ke dalam mulut daun cukup besar. Jika dibandingkan dengan pupuk berbentuk granular maka dalam penggunaannya sebagian akan larut terbawa oleh aliran air dan akar tidak akan menyerap semuanya.³

Pupuk nanosilika dibentuk melalui metode kimia yaitu dengan metode presipitasi, yaitu metode yang lazim digunakan untuk pengubahan ukuran partikel silika dengan penambahan larutan asam. Hasil presipitasi ini mempunyai ukuran partikel lebih kecil, seragam dan berbentuk koloid.³ Gambar 4 menunjukkan ukuran partikel pada pupuk nanosilika koloid yang terbentuk dengan teknik ini adalah 20-40 nm menurut uji karakterisasi dengan *transmission electron microscope* (TEM).³



Gambar 4. Pencitraan TEM Pupuk Nanosilika.³

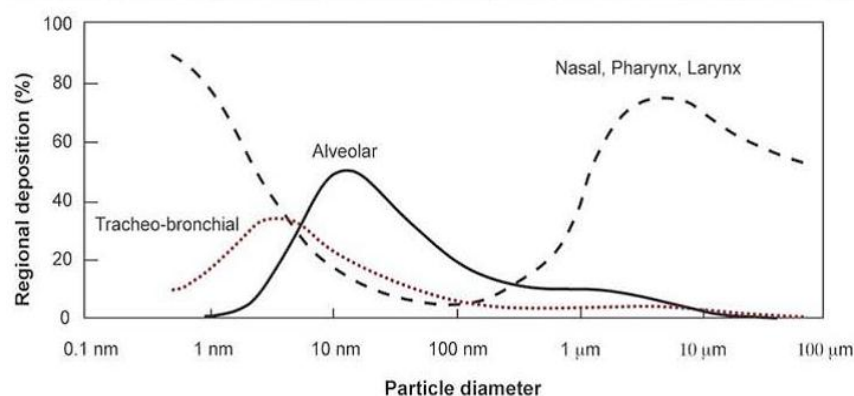
2.2 Pengaruh Inhalasi Pupuk Nanosilika terhadap Organ Hepar

Literatur atau sumber yang memaparkan tentang mekanisme toksisitas spesifik jenis nanopartikel silika masih sulit ditemukan, namun secara umum nanotoksikologi paparan nanosilika tentunya akan sejalan dengan nanopartikel pada umumnya dengan perbedaan minor dikarenakan karakter fisikokimia nanosilika yang membedakannya dari nanopartikel jenis lain. Tinjauan pustaka dibawah ini akan memaparkan mekanisme toksikologi paparan nanopartikel secara umum lewat jalur inhalasi hingga menimbulkan efek patologisnya di organ hepar.

2.2.1 *Uptake* Nanosilika pada Traktus Respiratorius dan Sistem *Clearence*

Setelah terhirup, nanopartikel mengendap di seluruh saluran pernafasan, mulai dari hidung dan faring, sampai ke paru-paru. Paru-paru manusia memiliki luas permukaan antara 75-140 m² dan sekitar 300 juta alveoli. Karena luas permukaannya, paru-paru adalah lokasi deposit utama untuk partikel yang terhirup. Partikel dengan diameter lebih kecil dari 10 mikron lebih dipengaruhi oleh difusi dan bisa mencapai permukaan alveoli yang melakukan pertukaran gas.

Sedangkan, partikel berdiameter yang lebih besar cenderung diendapkan di saluran nafas bagian atas sebagai akibat dari gravitasi, turbulensi dan tabrakan partikel. Banyak serat berdiameter lebih besar tertahan di persimpangan bronkus. Serat yang memiliki diameter kecil bisa menembus jauh ke paru-paru, serat dengan aspek rasio yang panjang akan tetap berada di saluran udara bagian atas. Seperti yang ditunjukkan pada Gambar 5, wilayah nasofaring menangkap terutama mikropartikel dan nanopartikel lebih kecil dari 10 nm, sedangkan paru-paru akan menerima terutama nanopartikel dengan diameter antara 10 - 20 nm.¹³



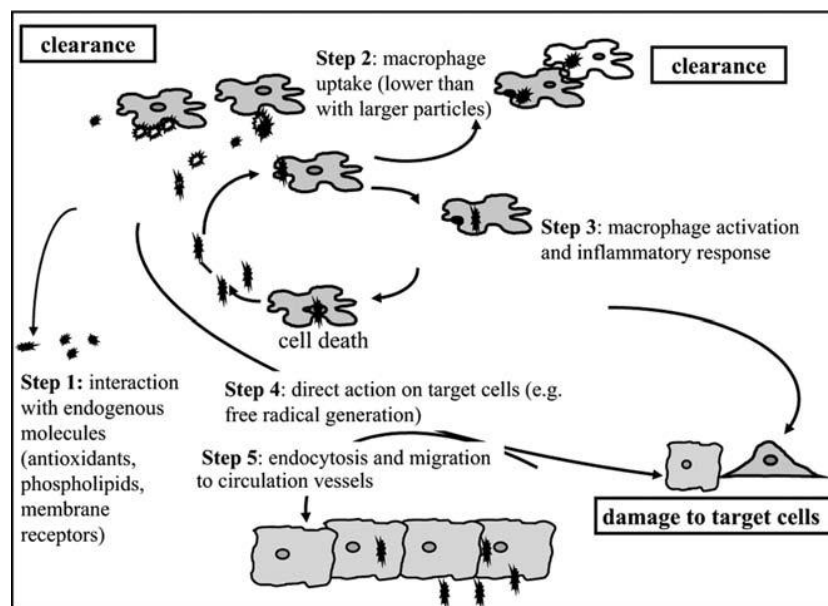
Gambar 5. Deposisi partikel yang terhirup di saluran pernapasan sesuai dengan ukurannya.¹³

Apabila nanopartikel berhasil menghindari sistem *clearence* saluran nafas atas berupa eskalator mukosilier pada dinding mukosa trakea, dan tidak *diuptake* oleh sel epitelial dari saluran nafas atas (*uptake* epitelial hanya terjadi pada epitel yang mengalami inflamasi sebelumnya), maka nanopartikel akan masuk ke dalam alveolus paru. Sedangkan nanopartikel yang berhasil dibersihkan oleh

sistem eskalator mukosilier akan masuk ke esophagus untuk selanjutnya dibuang lewat sistem gastrointestinal. Lapisan mukus di saluran napas juga mengandung antioksidan yang dapat dilepaskan apabila sejumlah komponen oksidatif terhirup.¹³

Pada saluran napas bagian bawah sistem *clearence* yang bekerja adalah fagositosis oleh makrofag pada alveolus. Makrofag akan memfagositosis nanopartikel asing yang kemudian akan didegradasi secara enzimatik atau apabila partikel gagal didegradasi, maka akan dibawa oleh makrofag menuju sistem eskalator mukosilier, sistem limfatik setempat atau masuk ke dalam sirkulasi darah. Dalam keadaan tertentu dimana banyak partikel asing yang masuk ke dalam paru dalam jangka waktu yang lama dan melebihi kemampuan makrofag, maka terjadi perekrutan neutrofil dari pembuluh darah setempat untuk membantu proses fagositosis.¹³

Fagositosis merupakan suatu proses yang kompleks yang dimulai dengan pengenalan komponen asing oleh reseptor khusus pada makrofag, opsonisasi atau penandaan molekul asing yang akan difagositosis, internalisasi dimana makrofag akan membentuk pseudopod sebelum menelan partikel asing masuk ke dalam makrofag, dan degradasi enzimatik yang melibatkan fagolisosom (yang berisi enzim proteolitik dan suatu radikal oksigen bernama NADPH oksidase). Hal inilah yang menyebabkan apabila ada kegagalan fagositosis komponen proteolitik dan radikal oksigen yang dikandung makrofag dapat keluar dari dalam sel sehingga terjadi respon inflamasi, stress oksidatif dan akumulasi debris (pus).¹³



Gambar 6. Mekanisme toksisitas nanopartikel.³³

Sistem fagositosis sangatlah dipengaruhi oleh ukuran partikel yang terinhalasi dan juga konsentrasi. Ukuran makrofag manusia adalah antara 14-21 um, sedangkan makrofag mencit/tikus 10-13 um. Makrofag efektif memfagositosis partikel asing yang ukurannya sebanding dengan ukurannya. Pada penelitian sebelumnya, menunjukkan bahwa pada ukuran partikel yang terlalu kecil, maka partikel akan lolos dari proses fagositosis dan berkemungkinan lebih besar untuk translokasi ke dalam sistem sirkulasi atau limfatik. Nanopartikel dengan konsentrasi tinggi cenderung akan mengalami agregasi. Sedangkan, nanopartikel yang cenderung beragregasi membentuk materi yang lebih besar akan lebih efektif difagositosis sampai ukuran tertentu yang masih dapat diatasi oleh makrofag.¹³

Hal lain yang mempengaruhi sistem *clearance* paru adalah kelarutan dan hidrofobisitas dari suatu partikel. Partikel yang hidrofobik akan lebih mudah

diopsonisasi oleh makrofag dan siap untuk di fagositosis. Partikel yang lebih mudah larut akan ditangkap oleh lapisan mucus epitelium dan dieliminasi lewat sistem limfatik dan sirkulasi sedangkan partikel yang sukar larut akan lebih cenderung difagositosis oleh makrofag dan kemudian di transport untuk dibuang lewat sistem escalator mukosilier.¹³

2.2.2 Translokasi Ekstrapulmoner Nanosilika ke Sirkulasi Sistemik

Dari paparan diatas maka dapat disimpulkan bahwa nanopartikel yang cenderung lebih mudah untuk bertranslokasi masuk ke pembuluh darah dan limfe adalah yang berukuran lebih kecil dengan konsentrasi rendah yang tidak berhasil diatasi oleh sistem *clearence* fagositosis paru. Hasil penelitian pada hewan coba menunjukkan bahwa nanopartikel metal lebih mudah mengalami translokasi dibandingkan non metal. Sedangkan nanosilika sendiri tergolong metalloid (transisi), yaitu memiliki sifat diantara golongan metal dan non metal. Penelitian dengan menggunakan nanopartikel menunjukan bahwa setelah inhalasi atau instilasi intranasal/intratrakeal/pharyngeal maka partikel nanopartikel dapat ditemukan di sirkulasi darah dan beberapa organ seperti jantung, otak, hepar, limpa serta ginjal. Kecepatan translokasi ke ekstrapulmoner setelah inhalasi nanopartikel dapat meningkat dengan adanya keadaan-keadaan berikut yang meningkatkan suseptibilitas terhadap nanopartikel, antara lain yaitu, inflamasi pulmoner, meningkatnya permeabilitas vaskuler pada pasien yang memiliki penyakit respiratorik atau penyakit yang berhubungan dengan darah.

Translokasi dari alveolus menembus sel epitel alveolar ke ekstrapulmoner (pembuluh sistemik maupun sistem limfatik) sangat tergantung dengan interaksi

nanosilika dengan membran sel. Seperti yang sebelumnya telah dibahas di sifat fisikokimia dari nanosilika, gugus silanol di permukaan nanosilika cenderung berinteraksi dengan protein atau cairan tubuh di sekitarnya dengan cara mendonorkan protonnya dan berikatan dengan protein membran sel lalu mendegradasinya. Translokasi ke dalam sel dapat terjadi melalui mekanisme kerusakan sel membran oleh gugus silanol, endositosis sel secara langsung (pinositosis, fagositosis atau *receptor-mediated endocytosis*) mekanisme *uptake* aktif lewat actin- dan clathrin-mediated endocytosis.³²

2.2.3 Uptake Nanosilika, Sistem Clearance dan Efek Negatif pada Hepar

Sekitar 30-99% nanopartikel yang diadministrasikan dan masuk ke dalam aliran darah akan mengalami filterisasi melalui hepar. Sistem *clearance* nanopartikel setelah masuk ke sirkulasi sistemik dapat melalui 3 jalur, yaitu ginjal (untuk partikel ukuran <6 nm, hepatobilier (untuk ukuran partikel >6nm) dan sistem *mononuclear phagocyt system* (MPS) atau retikuloendotelial system untuk partikel yang cenderung tidak dapat didegradasi.³⁸ Pada keadaan normal, sel endothelial (sel yang melapisi pembuluh vaskuler) membentuk barrier atau penghalang fisik untuk masuknya partikel yang tidak diinginkan dari atau ke dalam darah dan menyebar ke organ yang dilewatinya. Sel endotel memiliki *tight junction* yang sangat rapat untuk mendukung fungsinya ini, yaitu lebih kecil dari 2 nm. *Tight junction* ini dapat berubah ukurannya pada keadaan patologis sampai menjadi ukuran 50-100nm. Namun pada beberapa organ contohnya hepar, dikarenakan fungsi fisiologisnya, *tight junction* ini memiliki fenestrata/lubang lebih yang besar dengan ukuran sekitar 100nm. Hal ini lah yang menyebabkan

hepar menjadi salah satu organ target dalam penyebaran suatu substansi secara sistemik dan dapat terjadi akumulasi dari partikel ini apabila sistem *clearance* tidak berjalan dengan baik.¹³

Pada hepar, nanosilika mungkin di*uptake* oleh hepatosit maupun sel kupffer pada sinusoid. Nanopartikel bermuatan positif akan cenderung terakumulasi di hepatosit sedangkan nanopartikel bermuatan negatif cenderung lebih cepat di*uptake* oleh sel kupffer. Di sisi lain, nanopartikel yang bersifat inert tak dapat dimetabolisme dengan efektif oleh hepar. Jalur ekskresi nanopartikel yang di*uptake* hepar adalah melalui sistem hepatobilier. Nanopartikel yang berhasil melewati sel kupffer pada sinusoid hepar, akan melewati fenestrata pada endotel sinusoid hepar dan masuk ke celah Disse untuk kemudian di *uptake* oleh hepatosit untuk kemudian bersama cairan empedu akan masuk ke kanalikuli dan mengalir terus sampai ke ductus biliaris dan diekskresi bersama feces lewat sistem gastrointestinal.³⁴

Meskipun nanopartikel memiliki sistem *clearance* lewat sistem RES hepar yaitu sel kupffer dan lewat sistem hepatobilier, namun nanopartikel yang terakumulasi di dalam hepar akan meningkatkan efek hepatotoksik. Akumulasi dari nanopartikel di hepar dapat menyebabkan stress oksidatif, inflamasi, kerusakan DNA, kematian hepatosit, hingga fibrosis hepar pada beberapa kasus.

2.2.3.1 Stress Oksidatif pada Hepar

Stress oksidatif pada hepar disebabkan oleh produksi ROS berlebihan pada hepar. ROS yang berlebihan dapat dihasilkan dari mekanisme direk maupun

indirek pada sel. Produksi ROS ini sangat dipengaruhi sifat fisikokimia oleh nanopartikel seperti ukuran, bentuk, sifat permukaan dan komposisi dari nanopartikel itu sendiri.

2.2.3.1.1 Direk

Mekanisme produksi ROS secara direk disebabkan karena nanopartikel dapat memberikan dan menerima elektron dari molekul intraselular maupun ekstraselular, seperti H₂O dan O₂, yang akhirnya akan menghasilkan ROS abiotik secara spontan. Struktur permukaan spesifik pada nanosilika dapat mempengaruhi produksi ROS direk, sebagai contoh jenis fumed nanosilika menghasilkan lebih banyak ROS dibandingkan dengan nanosilika koloid, karena nanosilika fumed mempunyai tiga gugus cincin di permukaanya yang dapat berinteraksi dengan atom oksigen dan menghasilkan ROS.³⁴

2.2.3.1.2 Indirek

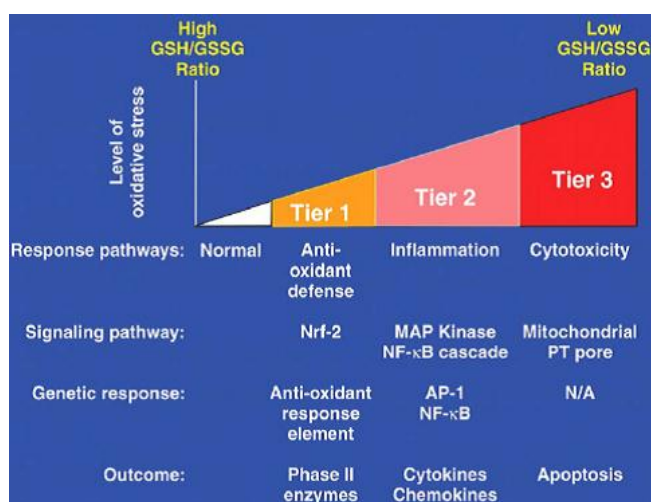
Sedangkan, yang lebih sering terjadi adalah produksi ROS secara indirek yaitu melalui jalur mitokondria dan NADPH oksidase.

- **Jalur Mitokondria**

Kebocoran elektron dari rantai respirasi dapat ditangkap oleh oksigen dan menghasilkan radikal ROS. Proses ini distimulasi oleh rangsang eksternal seperti hipoksia, sitokin, dan growth factor. ROS diproduksi lewat aktivasi dari jalur JNK dan p53 pada sel yang dapat berakhir dengan apoptosis sel, juga ditemukan penurunan potensial membran mitokondria dan kerusakan mitokondria.³⁴

- **Jalur NADPH oksidase**

NADPH oksidase adalah enzim yang terikat pada plasma membran sel fagositik maupun nonfagositik. Beberapa subunitnya terletak pada sitoplasma pada fase istirahat. Kemudian saat jalur ini diaktivasi, maka subunit pada sitoplasma akan bermigrasi ke membran sel dan membentuk struktur yang nantinya akan menginduksi aktivasi NLRP3 dan mensekresi IL-1 β .³⁴



Gambar 7. Tahapan terjadinya stress oksidatif.³⁴

Mekanisme stress oksidatif hepar diinduksi oleh produksi berlebihan *reactive oxygen species* (ROS) yang pada akhirnya dapat menyebabkan pelepasan mediator pro inflamasi dan menyebabkan gangguan mitokondria yang berakhir kematian sel/apoptosis. ROS pada jumlah yang sedikit penting untuk mekanisme pelepasan mediator Nrf-2 yang kemudian mengaktifkan jalur Keap1-Nrf2-ARE untuk menghasilkan antioksidan seperti *heme oxygenase 1* (HO-1), *glutathione-S-transferase isoenzymes*, *NADPH quinone oxidoreductase*, *superoxide dismutase* dan *glutathione peroxidase*.³⁴

Pada jumlah yang berlebihan ROS dapat mengaktifkan sistem lainnya yaitu inflamasi. Inflamasi karena stress oksidatif diperantarai oleh jalur mitogen-activated protein kinase (MAPK) dan nuclear factor kappa B (NF- κ B) dan akan menghasilkan respon pro-inflamasi yaitu sekresi sitokin dan kemokin. Beberapa jalur pro-inflamasi yang diinduksi antara lain jalur MAPK (JNK, ERK, p38 MAPK) yang menginduksi pelepasan TNF- α , dan jalur NF- κ B yang juga dapat menginduksi pelepasan TNF- α dan IL-6.³⁴

2.2.3.2 Inflamasi Hepar

Inflamasi pada hepar dapat terjadi lewat dua mekanisme yaitu melalui jalur stress oksidatif direk maupun tidak melalui perantara sistem imun. Sistem imun yang bertanggung jawab di hepar adalah sel kupffer yang terletak pada sinusoid hepar. Sel kupffer adalah makrofag residen spesifik pada organ hepar yang membentuk sekitar 80-90% total makrofag dalam tubuh. Makrofag dibentuk dari monosit yang memiliki reseptor permukaan yang terdiferensiasi khusus untuk mengenal berbagai macam xenobiotik yang masuk ke dalam sistem sirkulasi. Kecepatan *uptake* nanopartikel pada hepar tergantung oleh sifat fisikokimia nanopartikel itu sendiri. Sebagai contoh, nanopartikel yang memiliki muatan positif atau negatif yang tinggi pada permukaannya akan mengadsorpsi serum protein dan membentuk 'protein corona' yang melapisi permukaannya dan membuat terjadinya agregasi dan aglomerasi partikel menjadi lebih besar, sehingga nantinya lebih mudah untuk difagosit oleh makrofag/sel kupffer. Sedangkan nanopartikel yang cenderung inert atau netral akan menurunkan adsorpsi serum protein dan menghambat *uptake* oleh makrofag sehingga

memperlambat *clearance*. Semakin besar ukuran nanopartikel maka akan semakin mudah fagosisnya.³⁴

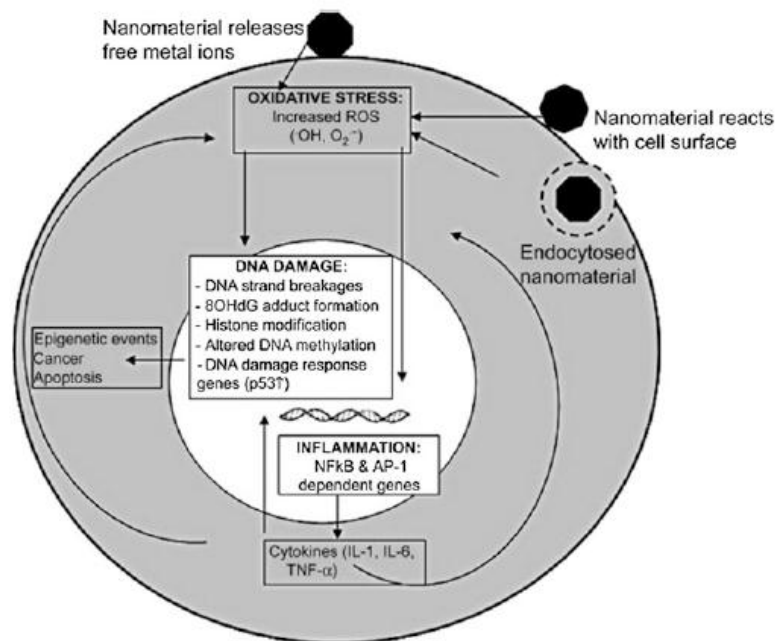
Sel kupffer mengenali nanopartikel asing dan akan diinternalisasi melalui beberapa mekanisme *scavenger receptor* seperti makropinositosis, *clathrin-mediated*, endositosis *caveolin-mediated*, dan mekanisme endositosis tambahan. Selama respon imun, sel kupffer melepaskan marker pro-inflamasi yang sangat poten dan sitokin yang menyebabkan inflamasi jaringan. Pada kasus sirosis, sel kupffer terus menerus melepaskan mediator pro-inflamasi dan sitokin sehingga menyebabkan inflamasi hepar yang berlebihan. Pada *single* injeksi nanosilika berukuran 15 nm dengan dosis 50 mg/kg menyebabkan hiperplasia sel kupffer dan inflamasi hepar pada tikus Sprague Dawley jantan.³⁸

Jika disimpulkan, terdapat 2 jalur yang terlibat dalam terjadinya inflamasi pada hepar karena induksi nanosilika, yaitu stress oksidatif direk karena pembentukan ROS oleh partikel nanosilika di dalam organ hepar, dan stress oksidatif indirek yang diperantarai oleh sel imun terutama sel kupffer. Sel kupffer yang terstimulasi setelah memfagositosis partikel nanosilika akan menginduksi stress oksidatif dengan menghasilkan ROS yang kemudian mengaktifkan faktor transkripsi yang responsif terhadap stress oksidatif seperti NF- κ B, dan akhirnya akan mensekresikan faktor inflamasi seperti IL-1 β , IL-6, IL-18, dan TNF- α . Atau sel kupffer juga dapat menginduksi inflamasi pada hepar lewat jalur NADPH oksidase berupa pengaktifan NLRP3 yang kemudian akan menginduksi *apoptosis-associated speck-like protein containing C-terminal caspase recruitment domain* (ASC), dan *caspase-1*. Lalu *caspase-1* akan menginduksi pembelahan prekursor

IL-1 β menjadi tipe IL-1 β yang matur dan berperan dalam respon inflamasi lokal maupun sistemik.^{39,40}

2.2.3.3 Kerusakan DNA Hepar

Nanopartikel dapat menyebabkan kerusakan DNA pada hepar melalui 2 mekanisme, yaitu secara langsung dan tidak langsung. Secara langsung, kerusakan DNA disebabkan oleh ikatan kovalen yang dibentuk antara nanopartikel dan DNA. Sedangkan kerusakan DNA tidak langsung (indirek) dapat terjadi melalui interaksi nanopartikel dengan protein nuklear sehingga mengganggu fungsi checkpoint pada siklus sel, dan stress oksidatif menyebabkan kerusakan DNA secara tidak langsung melalui produksi ROS dalam sel yang mengoksidasi DNA lewat radikal bebas.³⁴



Gambar 8. Mekanisme kerusakan DNA oleh nanopartikel.³⁴

2.2.3.4 Kematian Hepatosit

Kematian sel pada hepatosit salah satunya disebabkan oleh stress oksidatif akibat produksi ROS yang sangat berlebihan. Kematian hepatosit oleh stress oksidatif diawali dengan depolarisasi atau penurunan pada potensial membran sel mitokondria, diikuti dengan nekrosis yang kemudian menginduksi pelepasan faktor pro-apoptotik dan kematian sel. Terdapat 2 jalur yaitu intrinsik (*mitochondrial pathway*) dan ekstrinsik (*death-receptor pathway*). Pada toksisitas nanopartikel, kematian sel lebih sering disebabkan oleh jalur intrinsik atau mitokondria, hal ini dibuktikan dengan kenaikan ekspresi gen apoptosis (*caspase-3*, *p53*, *Bax*, *Bid*, *p21*, dll) penurunan ekspresi gen anti-apoptotik (*Bcl-2*), penurunan potensial membran mitokondria dan pelepasan sitokrom c dari mitokondria ke sitoplasma sel. Pada beberapa penelitian sebelumnya nanosilika dengan diameter 20 dan 80 nm dapat menginduksi nekrosis hepatosit.³⁴

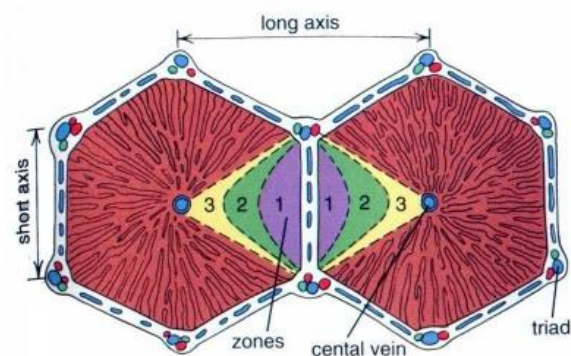
2.2.4 Pengaruh Nanosilika terhadap Histopatologi Hepar

Hepar merupakan organ yang bersifat sensitif terhadap bahan atau zat asing yang bersifat toksik, sehingga hepar rentan mengalami kerusakan dengan diawalinya lesi biokemik yang menyebabkan perubahan metabolisme dan dapat mengakibatkan perubahan metabolisme dan dapat mengakibatkan perubahan struktur serta perubahan fungsi hepar. Perubahan struktur dan fungsi dapat dilihat dari perubahan unit fungsional utama hepar yang disebut dengan lobulus hepar. Lobulus hepar secara fungsional dibagi menjadi 3 zona, yaitu:

1. Zona 1 : Zona aktif, sel-selnya yang paling dekat dengan trias portal dan menerima paling banyak darah yang mengandung oksigen

2. Zona 2 : Zona intermedia, sel-selnya memberi respon kedua terhadap darah

3. Zona 3 : Zona pasif, aktivitas sel-selnya rendah dan tampak aktif bila kebutuhan meningkat. Zona ini yang paling jauh dengan trias porta dan menerima darah yang mengandung oksigen dengan kadar paling sedikit.



Gambar 9. Lobulus hepar dengan zona 1, 2, dan 3.⁴¹

Apabila hepar dipapari oleh oksidan maupun zat toksik yang berlebihan maka hepar dapat mengalami perubahan patologis, perubahan struktur tersebut yang dapat dilihat secara mikroskopis adalah:

1. Radang

Merupakan suatu reaksi pertahanan tubuh dalam melawan berbagai jejas. Pada hepar yang mengalami peradangan, secara mikroskopik dapat ditemukan sel polimorfonuklear, fagosit, monosit dan limfosit.

2. Degenerasi

Degenerasi sel adalah perubahan struktur sel normal sebelum terjadi kematian sel. Degenerasi dapat terjadi di inti maupun sitoplasma. Berikut ini merupakan degenerasi pada inti sel hepar:

- Vakuolisasi : Degenerasi yang ditandai dengan inti tampak membesar dan bergelembung, serta kromatinnya jarang
- Badan Inklusi : Inti sel hepar yang mengandung inclusion bodies eosiofilik

Selain degenerasi pada inti sel, terdapat juga perubahan pada proses degenerasi sitoplasma sel. Berikut ini merupakan jenis-jenis degenerasi sitoplasma pada sel hepar antara lain:

a. Degenerasi Hidropik

Degenerasi yang terjadi karena adanya gangguan membran sel sehingga cairan masuk ke dalam sitoplasma, yang menyebabkan terbentuknya vakuola-vakuola kecil sampai besar. Sel umumnya lebih besar sinusoid hepar tampak lebih sempit bila dibandingkan dengan keadaan normal. Degenerasi ini bersifat reversibel

b. Degenerasi Hyalin

Degenerasi yang berat, dan merupakan lanjutan dari degenerasi hidropik. Terjadi akumulasi protein diantara jaringan ikat.

c. Degenerasi Albuminosa

Degenerasi yang paling ringan berupa pembengkakan dan kekeruhan sitoplasma. Sel hepar bengkak dengan sitoplasma yang berbutir keruh, mungkin disebabkan oleh pengendapan protein yang disebabkan oleh gangguan metabolisme

energy dalam sel yang membuat sel tidak mampu memompa natrium keluar dari sel.

d. Degenerasi lemak

Degenerasi yang ditandai dengan adanya penimbunan lemak pada parenkim hepar, dapat berupa bercak, zonal atau merata. Fase terakhir dari degenerasi lemak adalah sel hepar tampak berisi globuli lemak yang besar sehingga nucleus terlihat terdesak ke arah tepi.

e. Degenerasi Albuminoid

Terjadi penimbunan amyloid, suatu kompleks protein-karbohidrat, tampak dalam celah disse.

3. Nekrosis

Nekrosis adalah kematian sel hepar atau jaringan hepar diantara sel yang masih hidup. Nekrosis biasanya memiliki distribusi zona tertentu. Nekrosis paling jelas tampak jika terjadi segera pada hepatosit yang terletak di sekitar vena hepatica terminalis. Berdasarkan lokasi dan luas area dari nekrosisnya dapat dibedakan menjadi sebagai berikut:

a. Nekrosis Fokal

Kematian sel atau sekelompok sel dalam lobulus, yang dapat ditemukan adanya leukosit, histiosit dan sel Kuppfer

b. Nekrosis Zonal

Kerusakan sel hepar dalam satu lobulus

c. Nekrosis Masif dan Submasif

Terjadi perlemakan pada sel hepar yang masih hidup terutama sentrilobuler dan disertai pigmen lipofuscin, hepatosit dalam lobulus menjadi hilang akibat dari nekrosis masif.

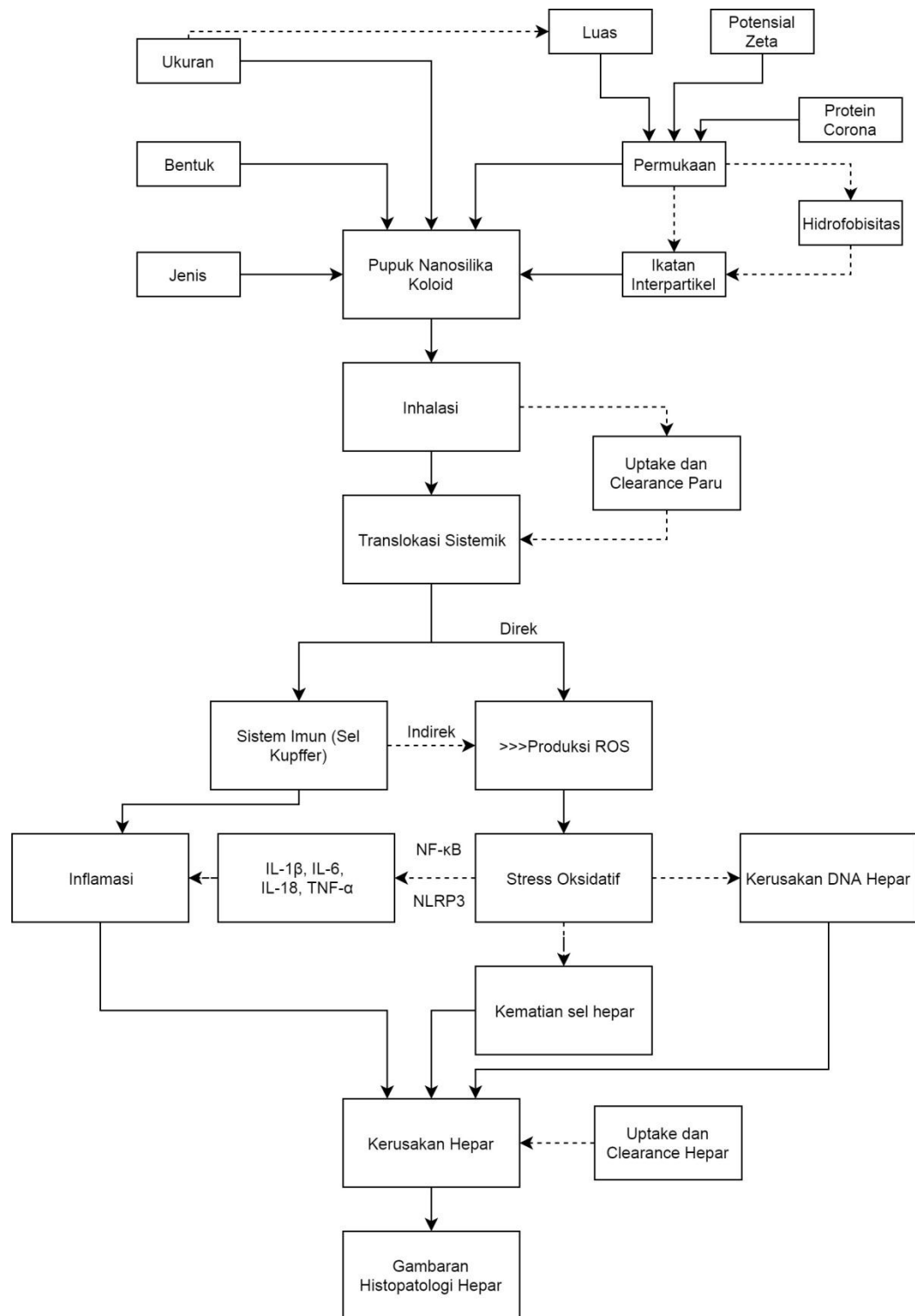
d. Nekrosis Anoksik

Terjadinya kekurangan oksigen pada nekrosis zonal, masif atau submasif dan biasanya tidak merusak sel jaringan ikat lainnya.

4. Fibrosis

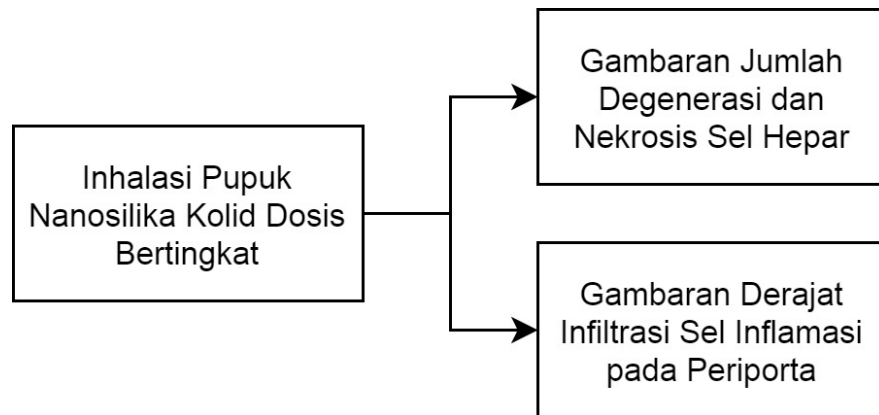
Fibrosis terjadi akibat kurangnya kemampuan regenerasi sel hepar yang cukup dalam jangka waktu yang lama.

2.3 Kerangka Teori



Bagan 1. Kerangka Teori

2.4 Kerangka Konsep



Bagan 2. Kerangka Teori

2.5 Hipotesis

2.5.1 Hipotesis Mayor

Terdapat perubahan gambaran histopatologi organ hepar pada kelompok tikus *Wistar* jantan yang diberi paparan inhalasi pupuk nanosilika.

2.5.2 Hipotesis Minor

1. Terdapat peningkatan jumlah degenerasi dan nekrosis sel hepar periporta yang terlihat pada gambaran mikroskopik organ hepar pada tikus *Wistar* jantan yang diberi paparan inhalasi pupuk nanosilika.
2. Terdapat gambaran infiltrasi sel inflamasi porta yang terlihat pada gambaran mikroskopik organ hepar pada tikus *Wistar* jantan yang diberi paparan inhalasi pupuk nanosilika.