

PENGARUH PEMBERIAN ASAM KLOGROGENAT TERHADAP EKSPRESI mRNA TLR-4, mRNA MCP-1, JUMLAH MAKROFAG M1 DAN M2 PADA GINJAL MENCIT SWISS WEBSTER DENGAN MODEL UNILATERAL URETERAL OBSTRUCTION (UUO)

Tiara Meirani Valeria Savista^{1,2,3*}, Junaedy Yunus¹, Nur Arfian¹

¹Departemen Anatomi Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat, dan Keperawatan Universitas Gadjah Mada

²Mahasiswa Program Pascasarjana Magister Ilmu Biomedik Universitas Gadjah Mada

³Departemen Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Alkhairaat

*Corresponding author: Telp: +62811452389, email: tiaramvs@gmail.com

ABSTRAK

Penyakit ginjal kronis (CKD) adalah masalah kesehatan global dengan prognosis buruk yang mengarah ke fibrosis ginjal. Obstruksi ureter unilateral (UUO) adalah metode yang representatif untuk memodelkan fibrosis ginjal. Penelitian ini merupakan penelitian kuasi eksperimen dengan desain kelompok post-test dengan 25 ekor mencit Swiss Webster jantan dewasa yang dibagi menjadi lima kelompok, yaitu SO, U7, U14, UC7, UC14. Ekspresi mRNA TLR-4 diperiksa dan mRNA MCP-1 diperiksa oleh RT-PCR. Jumlah makrofag M1 dan M2 dengan pewarnaan IHC. Data diproses menggunakan SPSS. Pada kelompok yang diinduksi UUO dan yang diinjeksi Aquadest, ekspresi mRNA TLR-4, mRNA MCP-1 dan jumlah makrofag M1 dan M2 lebih tinggi daripada kelompok kontrol ($p < 0,005$), sedangkan kelompok yang diinduksi UUO dan diinduksi kelompok asam klorogenik menunjukkan mRNA TLR-4, mRNA MCP-1, jumlah makrofag M1 yang lebih rendah dan jumlah makrofag M2 yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok UUO yang diinjeksi dengan Aquadest ($p < 0,005$). Pemberian asam klorogenat dapat mencegah fibrosis ginjal dengan cara menurunkan ekspresi mRNA TLR-4, mRNA MCP-1, jumlah makrofag M1 dan meningkatkan jumlah mRNA M2.

Kata Kunci: *Unilateral Ureteral Obstruction (UUO)*, asam klorogenat, TLR-4, MCP-1

ABSTRACT

Chronic kidney disease (CKD) is a worldwide health problem with a poor prognosis in the form of renal fibrosis. Unilateral ureteral occlusion (UUO) is a representative method for generating a renal fibrosis model. This study was a quasi-experimental study using post-trial group. This study was performed on 25 Swiss Webster adult male rat subjects divided into 5 groups, SO, U7, U14, UC7 and UC14. Expression of TLR-4 mRNA and MCP-1 mRNA was assessed by RT-PCR. The number of M1 and M2 macrophages was assessed by IHC staining. The data obtained were analyzed using SPSS. The group induced UUO by aquadest injection showed higher TLR-4 mRNA expression, MCP-1 mRNA expression, and a higher number of M1 and M2 macrophages than the UUO ($p < 0.005$). The UUO-induced group using chlorogenic acid showed lower TLR-4 mRNA expression, MCP-1 mRNA expression, M1 and M2 macrophage number than the UUO-induced group. out by injecting aquadest ($p < 0.005$). Chlorogenic acid treatment attenuated renal fibrosis by decreasing the mRNA expression of TLR-4, MCP-1, the number of M1 macrophages and increasing the number of M2 macrophages.

Keywords: Unilateral Ureteral Obstruction (UUO), chlorogenic acid, TLR-4, MCP-1

PENDAHULUAN

Gagal Ginjal Kronik (GGK) merupakan masalah kesehatan global yang memiliki prognosis buruk. Prevalensi GGK tertinggi di Indonesia yaitu, provinsi Sulawesi Tengah sebesar 0,5% dan Provinsi DIY sebesar 0,3%¹. Gagal ginjal kronik terjadi akibat adanya cedera seperti obstruksi. Cedera ini menyebabkan terjadinya perubahan struktur ginjal seperti adanya inflamasi, atrofi, apoptosis tubulus, serta fibrosis pada ginjal². Fibrosis merupakan deposisi berlebihan dari protein matriks ekstraseluler dalam jaringan yang menyebabkan terbentuknya jaringan parut. Adanya perubahan struktur akibat fibrosis pada ginjal mengakibatkan hilangnya fungsi fisiologis ginjal sampai menjadi End Stage Renal Disease (ESRD)³.

Gagal ginjal kronis (GGK) ditandai dengan penurunan progresif dari fungsi ginjal dalam periode beberapa bulan hingga menahun. Penurunan fungsi ginjal ditandai dengan penurunan laju filtrasi glomerulus. Kondisi GGK menyebabkan terjadinya akumulasi matriks ekstraseluler yang mengarah ke fibrosis interstisial ginjal⁴. Infiltrasi makrofag juga menjadi tanda khas GGK, banyaknya jumlah yang menginfiltrasi berkorelasi terbalik dengan kelangsungan hidup organ ginjal⁵.

Fibrosis interstisial ginjal dapat diinduksi dengan melakukan model *Unilateral Ureteral Obstruction* (UUO). Pada UUO ginjal akan mengalami inflamasi, cedera tubulus, dan kematian sel pada minggu pertama obstruksi⁶. Salah satu mekanisme yang terdapat dalam fibrosis adalah inflamasi yang diperankan oleh *Toll-like Receptor-4* (TLR-4) merupakan mediator yang memiliki peran penting dalam sistem imun bawaan dengan memicu jalur sinyal proinflamasi dalam respon terhadap kerusakan jaringan. Pada model fibrosis ginjal dengan metode UUO, TLR-4 akan mengalami peningkatan⁷.

Metode UUO akan meningkatkan TLR-4 dalam 6 hari setelah perlakuan². *Intercellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1) dan *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1) meningkat beberapa jam setelah perlakuan, memediasi kemotaksis dan adhesi makrofag².

Adanya plastisitas dari fenotipe makrofag terutama dalam patogenesis fibrosis cukup membingungkan para ahli. Makrofag M1 dianggap sebagai sel yang pro-inflamasi, karena kemunculannya dimaksudkan untuk menghilangkan berbagai faktor yang dianggap patogen oleh tubuh, melalui sitokin TNF- α dan interferon- γ (IFN- γ), proses inflamasi dimulai setelah adanya paparan etiologi yang dapat merusak ginjal⁸. Monosit inflamasi mengalami diferensiasi menjadi makrofag M1 atau makrofag M2⁹. Metode UUO memberikan gambaran dominasi makrofag M1 pada hari 1-7 setelah perlakuan dan dominasi M2 pada hari ke 8-14 setelah perlakuan¹⁰.

Asam klorogenat merupakan suatu senyawa *fenolic* yang larut dalam air dan terbentuk dari esterifikasi asam *quinic* dan asam *trancinnamic* tertentu seperti asam kafein, asam *ferulic* dan asam *pcoumaric*. Asam klorogenat digunakan sebagai obat herbal karena memiliki kandungan antioksidan dan antiinflamasi yang kuat¹¹. Bahan aktif ini mampu memperbaiki disfungsi ginjal dan cedera ginjal yang diinduksi cisplatin dengan menekan stres oksidatif, apoptosis dan autofagi, dengan meningkatkan regenerasi ginjal¹². Saat ini penelitian mengenai peran dan pemanfaatan asam klorogenat untuk pencegahan GGK masih belum banyak dilakukan, sehingga perlu dilakukan penelitian ini untuk menilai peranan asam klorogenat terhadap ekspresi mRNA TLR-4, mRNA MCP-1, jumlah makrofag M1 dan M2 dengan menggunakan model mencit UUO sehingga dapat menjadi pertimbangan sebagai suatu agen terapi baru.

METODOLOGI

Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true experiment* menggunakan pendekatan *post-test only controlled group design*. Terdiri dari kelompok kontrol dan perlakuan. Penelitian ini telah memperoleh izin Komite Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Tadulako berdasarkan surat keterangan kelayakan etik dengan nomor B.0959/UN28.1.30/KL/2018 pada tanggal 26 Februari 2018.

Hewan Coba Model Unilateral Ureteral Obstruction (UUO)

Mencit dianestesi menggunakan *sodium pentobarbital* dengan dosis yang diberikan 0,1 ml/10gBB/kali. Setelah efek anestesi tercapai, kemudian mencit ditempatkan di meja operasi dengan posisi pronasi. Rambut mencit dibagian punggung kanan dicukur, kemudian didesinfeksi menggunakan *povidone iodine*, dijepit dengan pinset, lalu dilakukan pemotongan kulit sepanjang $\pm 1,5$ cm sejajar sumbu tubuh pada regio lumbal disebelah lateral kanan *os vertebrae* (regio *flank*). Pengguntingan dilakukan hingga peritoneum terlihat. Jepit peritoneum dengan pinset dan kemudian gunting ± 1 cm hingga organ *visceral* terlihat. Identifikasi terlebih dahulu organ ginjal, kemudian dengan menggunakan pinset bengkok susuri bagian polus inferior kemudian ungit hingga ureter tampak. Lakukan ligasi ureter pada daerah proksimal sebanyak dua kali dari polus inferior menggunakan benang silk 0.4 Peritoneum dan kulit dijahit lapis demi lapis menggunakan silk 0.4, lalu berikan *povidone iodine* sebagai antiseptik.

Pemberian Asam Klorogenat

Asam Klorogenat (Sigma-Aldrich C3878-1G) diinjeksi pada mencit dengan dosis 14 mg/kgBB/hari secara intraperitoneal. Mencit

dibagi menjadi 5 kelompok. Adapun pembagian untuk setiap kelompoknya sebagai berikut: kelompok *sham operation* (SO), diinjeksi akuades intraperitoneal selama 14 hari sebagai kontrol; kelompok U7, mencit dengan UUO yang diinjeksi akuades secara intraperitoneal selama 7 hari; kelompok UC7, mencit dengan UUO yang diinjeksi asam klorogenat selama 7 hari; kelompok U14 mencit dengan UUO yang diinjeksi akuades secara intraperitoneal selama 14 hari; kelompok UC14 mencit dengan UUO yang diinjeksi asam klorogenat selama 14 hari.

Pemeriksaan Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Jaringan ginjal diekstraksi menggunakan larutan *RNA isoplus* (GENEzolTM, GZR100) berdasarkan protokol dari produsen. Konsentrasi RNA dikuantifikasi menggunakan spektrofotometer. Sintesis RNA ke cDNA dilakukan dengan menggunakan 5-RT-Buffer (Toyobo, Cat. No. TRT-101), deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP) (Takara, Cat. No. 4030), *ReverTraAce*[®] (Toyobo, Cat. No. TRT-101) dan *random primer* (TAKARA, Cat. No. 3801). Selanjutnya dilakukan PCR dengan kondisi 30°C selama 10 menit (denaturasi), 42°C selama 60 menit (annealing), dan 99°C selama 5 menit (ekstensi).

Reverse Transcription-PCR dilakukan dengan primer TLR-4 (forward: 5'-TTGGCCACGTTTTTCTCC-3'; reverse: 5'-TGGCTGCAGAGAGGCTGT-3'), primer MCP-1 (forward: 5'-CCACTGGGGTTCTATATGTGCG-3'; reverse: 5'-AAATAGTCCGGTTCCCAATGAAG-3'), primer GAPDH (forward: 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA--3'; reverse: 5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG -3'), kemudian dilakuakn in 35 siklus untuk TLR-4 dengan kondisi 94°C selama 10

detik(denaturasi), 57°C selama 30 detik (*annealing*), dan 72°C selama 1 menit (*extension*) dan 72°C selama 10 menit (*final extension*), dan 40 siklus untuk MCP-1 dengan kondisi 94°C selama 10 detik (denaturasi), 60°C selama 30 detik (*annealing*), 72°C selama 1 menit (*extension*) dan 72°C selama 10 menit (*final extension*).

Selanjutnya dilakukan pencampuran antara cDNA dengan Taq Master Mix (GoTaq®Green Master Mix, Cat. No. M7122). Produk PCR dianalisis pada gel agarose 2% dengan DNA ladder (Bioron, Germany, Cat. 306009). Ekspresi gen dikuantifikasi dengan analisis densitometri menggunakan *software ImageJ*® dan GAPDH digunakan untuk menormalisasi ekspresi.

Pemeriksaan Immunohistochemistry (IHC) antibodi anti CD68 dan anti Arginase 1

Melakukan deparafinisasi dan rehidrasi pada *slide* dilanjutkan dengan *running water* selama 5 menit, kemudian dilakukan antigen *retrieval* dengan metode pemanasan menggunakan buffer sitrat selama 20 menit. Kemudian memindahkan *slide* ke *humidity chamber*, lalu mencuci dengan PBS 3 kali masing-masing 5 menit. Menambahkan H₂O₂ 3% selama 5 menit untuk inhibisi peroksidase, kemudian dicuci dengan PBS 3 kali masing-masing 5 menit. Kemudian menambahkan *blocking sniper* 1-2 tetes pada tiap *slide*, lalu di tutup dengan parafilm selama 20 menit, dilanjutkan dengan aplikasi antibodi anti CD68 pada *slide*, di tutup dengan parafilm, kemudian di diamkan 1 malam. Pada hari berikutnya *slide* dicuci dengan PBS 3 kali masing-masing 5 menit, kemudian mengaplikasikan *secondary antibodi* menggunakan *trekkie universal* 1-2 tetes, lalu di tutup dengan *parafilm* selama 60 menit-90 menit, kemudian dicuci dengan PBS 3 kali masing-masing 5 menit, lalu ditetaskan *TrekAvidin HRP label* 1-2 tetes, kemudian

ditutup dengan *parafilm* selama 45 menit, kemudian dicuci dengan PBS 3 kali masing-masing 5 menit. Kemudian mengaplikasikan DAB 1:200, kemudian dilihat di mikroskop, jika sudah terwarnai dicuci dengan air mengalir 5 menit, kemudian direndam dengan *haematoxylin* 10 detik, dicuci dengan air mengalir selama 5 menit, kemudian dilanjutkan dengan dehidrasi dan rehidrasi dengan xilena 3 kali 5 menit. Tahap terakhir dilakukan *mounting*. Selanjutnya menghitung M1 pada sediaan histopatologi ginjal mencit dengan pembesaran 400 kali, serta dikuantifikasi menggunakan *software image J*®. Mengulangi langkah diatas untuk antibodi anti arginase 1, selanjutnya menghitung dari masing-masing makrofag M1 dan M2 secara bergantian.

Analisis Hasil

Data yang diperoleh dari penelitian dianalisa dengan menggunakan perangkat lunak SPSS 22 for Windows. Uji normalitas data dengan menggunakan *Shapiro-Wilk*. Hasil uji normalitas ekspresi mRNA TLR-4, dan mRNA MCP-1 terdistribusi normal, dilanjutkan dengan uji *one-way ANOVA*. Hasil uji normalitas jumlah makrofag M1 dan M2 tidak terdistribusi normal, dilanjutkan dengan uji *Kruskal Wallis*. Nilai $p < 0,05$ digunakan untuk menentukan level signifikansi.

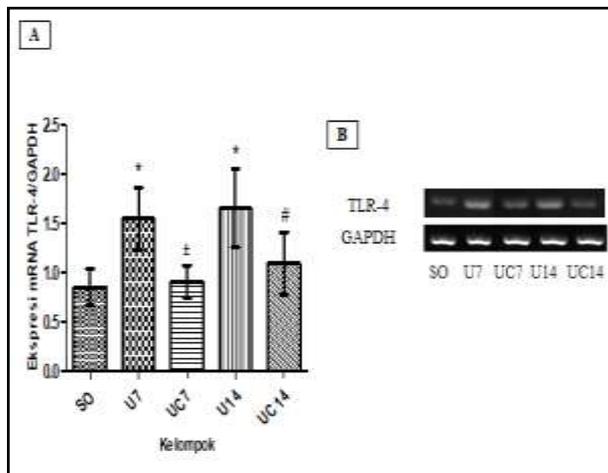
HASIL DAN PEMBAHASAN

HASIL

Ekspresi MRNA TLR-4

Untuk mengevaluasi efek anti-inflamasi dari asam klorogenat, kami mengukur ekspresi mRNA TLR-4 pada jaringan ginjal dengan analisis densitometri. Gambar 1 menunjukkan pada kelompok U7 (1,55±0,31) dan U14 (1,65±0,39) memiliki ekspresi mRNA TLR-4 yang lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol SO

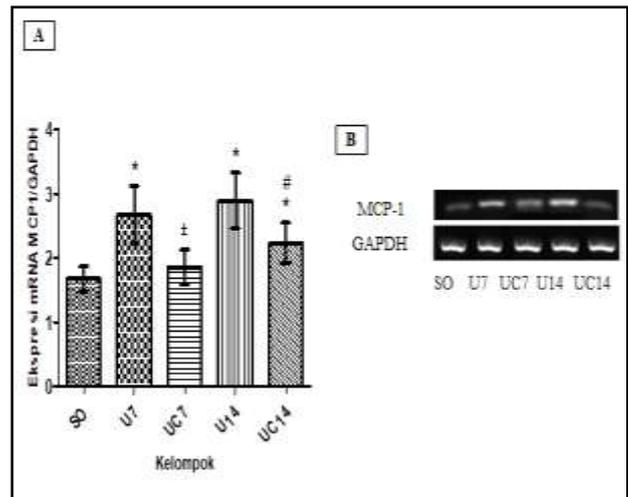
(0,855±0,18) Kelompok mencit yang mendapatkan asam klorogenat yaitu UC7 (0,91±0,16) dan UC14 (1,09±0,31) memiliki ekspresi mRNA TLR-4 yang lebih rendah dibandingkan kelompok yang diinduksi UUU.



Gambar 1.A. Diagram Batang nilai rerata (±SD) ekspresi mRNA TLR-4. Nilai p menggunakan uji *one-way Anova* ($p=0,000$). *= $p<0,05$ vs SO, ±= $p<0,05$ vs U7, #= $p<0,05$ vs U14. **B.** Gambaran *band* ekspresi mRNA TLR-4 dan GAPDH

Ekspresi mRNA MCP-1

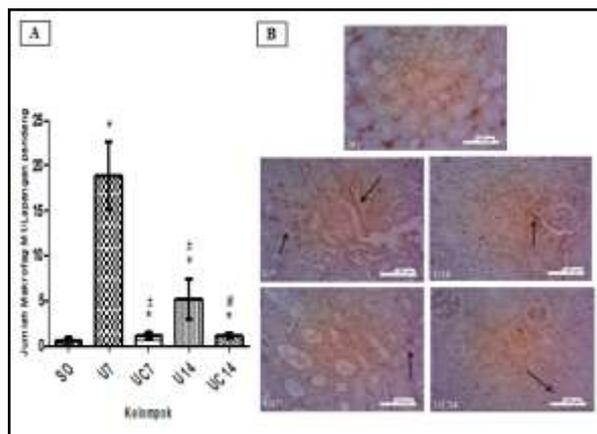
Untuk mengevaluasi efek anti-inflamasi dari asam klorogenat, kami mengukur ekspresi mRNA MCP-1 pada jaringan ginjal dengan analisis densitometri. Gambar 2 menunjukkan pada kelompok U7 (2,66±0,45) dan U14 (2,89±0,43) memiliki ekspresi mRNA MCP-1 yang lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol SO (1,68±0,19). Kelompok mencit yang mendapatkan asam klorogenat yaitu UC7 (1,85±0,27) dan UC14 (2,23±0,31) memiliki ekspresi mRNA MCP-1 yang lebih rendah dibandingkan kelompok yang diinduksi UUU.



Gambar 2. A. Diagram batang nilai rerata (±SD) ekspresi mRNA MCP-1. Nilai p menggunakan uji *one-way Anova* ($p=0,000$). *= $p<0,05$ vs SO, ±= $p<0,05$ vs U7, #= $p<0,05$ vs U14. **B.** Gambaran *band* ekspresi mRNA MCP-1 dan GAPDH

Jumlah Makrofag M1

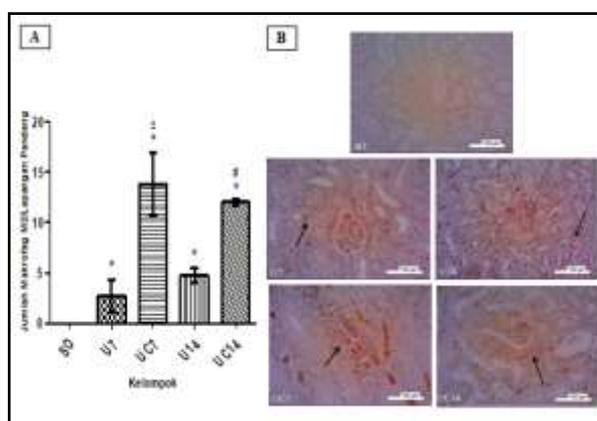
Untuk mengevaluasi efek asam klorogenat terhadap jumlah makrofag M1, kami melakukan pewarnaan immunohistokimia CD68 pada sampel jaringan ginjal. Gambar 3 menunjukkan kelompok U7 (18,83±3,34) dan U14 (5,18±2,25) memiliki jumlah makrofag yang lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol SO (0,2±0,34). Kelompok yang mendapatkan asam klorogenat UC7 (1,09±0,39) dan UC14 (1,07±0,29) memiliki Jumlah makrofag M1 yang lebih rendah dibandingkan kelompok mencit yang diinduksi UUU.



Gambar 3.A. Diagram batang nilai rerata (\pm SD) jumlah makrofag M1. Nilai p menggunakan uji *Kruskal wallis* ($p=0,000$). $*$ = $p<0,05$ vs SO, \pm = $p<0,05$ vs U7, $\#$ = $p<0,05$ vs U14. **B.** Gambaran mikroskopis ginjal dengan pewarnaan IHC. Panah hitam menunjukkan sel positif makrofag M1.

Jumlah Makrofag M2

Untuk mengevaluasi efek asam klorogenat terhadap jumlah makrofag M2, kami melakukan pewarnaan immunohistokimia arginase 1 pada sampel jaringan ginjal. Kelompok U7 ($2,68\pm 1,63$) dan U14 ($4,74\pm 0,78$) memiliki jumlah makrofag M2 yang lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol SO.



Gambar 4. A. Diagram batang nilai rerata (\pm SD) jumlah makrofag M2. Nilai p menggunakan uji *Kruskal wallis* ($p=0,000$). $*$ = $p<0,05$ vs SO, \pm = $p<0,05$ vs U7, $\#$ = $p<0,05$

vs U14. **B.** Gambaran mikroskopis ginjal dengan pewarnaan IHC. Panah hitam menunjukkan sel positif makrofag M2.

Kelompok mencit yang mendapatkan asam klorogenat UC7 ($13,82\pm 3,07$) dan UC14 ($12,02\pm 0,34$) memiliki Jumlah makrofag M2 yang lebih tinggi dibandingkan kelompok mencit yang diinduksi UUO.

PEMBAHASAN

Kejadian cedera tubulus akan mencetuskan inflamasi yang dapat berujung fibrosis dapat dilihat pada kelompok U7 dan U14 jumlah makrofag M1 signifikan dibandingkan kelompok SO. Perlakuan UUO pada hari ke 3 dan ke 7 menunjukkan peningkatan yang signifikan dari sel M1 terhadap kelompok SO¹³. Jumlah sel M1 yang meningkat pada UUO merupakan sebuah respon terhadap adanya cedera tubulus yang timbul, dimana awal dari suatu jejas selalu didahului dengan mekanisme peradangan sebagai bentuk pertahanan. Proses inflamasi selalu melibatkan berbagai sitokin seperti TNF- α , IFN- γ , IL-1, serta ROS, sehingga tercipta suasana *microenvironment* yang mendukung fenotipe makrofag ke arah M1¹⁴.

Eksresi mRNA TLR- 4 pada kelompok U7 dan U14 lebih tinggi dibandingkan pada kelompok SO. Ekspresi mRNA TLR-4 meningkat secara signifikan pada mencit UUO pada hari ke-3 dan bertahan selama 14 hari⁷. TLR-4 berikatan dengan ligan-ligan endogen seperti HMGB1 yang dihasilkan saat terjadi cedera pada jaringan ginjal. Aktivasi TLR-4 akan meningkatkan keparahan cedera tubulus sebelumnya karena produksi sitokin-sitokin proinflamasi dan infiltrasi sel radang. Proses inflamasi ini terjadi karena aktivasi NF- κ B melalui *myD88-dependent pathway* sehingga menghasilkan sitokin dan kemokin MCP-1⁶.

Eksresi mRNA MCP-1 pada kelompok U7 dan U14 lebih tinggi dibandingkan pada

kelompok SO. Ekspresi mRNA MCP-1 meningkat secara signifikan pada hari ke 7 dan 14 hari setelah UUO¹⁵. *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1) berperan pada proses inflamasi, termasuk ke dalam kelas C-C dari famili beta-kemokin. Kemokin berfungsi menstimulasi terjadinya kemotaksis dan perpindahan transendotelial dari *chemokine receptor 2* (CCR2) yang diekspresikan secara terus-menerus oleh monosit¹⁶.

Berdasarkan pengamatan yang dilakukan pada kelompok U7 dan U14 jumlah makrofag M2 lebih tinggi dibandingkan kelompok SO. Peningkatan makrofag M2 dimulai pada hari ke-7 dan berlanjut hingga hari ke-14 setelah perlakuan UUO¹⁷. Jumlah sel M2 yang meningkat ini diduga sebagai kompensasi dari kemunculan M1 pada fase awal UUO, karena makrofag M2 mensekresi berbagai faktor anti inflamasi yang bertujuan untuk menghentikan proses peradangan yang berlangsung¹⁸.

Pemberian asam klorogenat menunjukkan Makrofag M1 yang lebih rendah dibandingkan dengan UUO. Asam klorogenat mampu menurunkan ekspresi MCP-1 dan CD68¹⁹. Penurunan makrofag oleh asam klorogenat dengan menurunkan *Macrophage Migration Inhibitory Factor* (MIF) dan *Macrophage Inflammatory Protein* (MIP)²⁰. Asam klorogenat juga menurunkan ekspresi gen penanda makrofag di jaringan adiposa seperti CD11c, CD11b, CD68, dan F4 / 80 dan pro-inflamasi gen mediator seperti MCP-1 dan TNF- α dalam makrofag²¹. Penurunan reaksi inflamasi berkurang sehingga TLR-4 akan berkurang. Asam klorogenat dapat menghambat sinyal pada jalur TLR-4 termasuk mengurangi ekspresi iNOS dan COX-2²¹. Jalur TLR-4 merupakan jalur reseptor inflamasi, sehingga apabila jalur ini terhambat maka sitokin-sitokin proinflamasi akan terhambat. Sitokin-sitokin tersebut antara lain TNF- α , IL-6, dan IL-1 β .

TLR-4 yang tidak mendapat sinyal DAMP akibat pemberian asam klorogenat akan mengurangi kemokin yang mencetuskan inflamasi. Salah satunya ekspresi MCP-1 yang lebih rendah setelah diberikan asam klorogenat. Asam klorogenat dapat menurunkan ekspresi MCP-1 melalui inhibisi jalur NF- κ B yang dimulai dari penekanan ekspresi TLR-4 dan translokasi NF- κ B²³. Asam klorogenat baru diketahui mampu menghambat MCP-1 lewat jalur NF- κ B dimulai dari penghambatan ekspresi mRNA TLR-4 dan translokasi NF- κ B²⁴.

Makrofag M2 akan tercetus apabila terjadi cedera jaringan untuk memperbaiki jaringan. Salah satu peran asam klorogenat adalah sebagai antiinflamasi. Penelitian ini menunjukkan jumlah makrofag M2 pada kelompok UC7 dan UC14 lebih tinggi dibandingkan pada kelompok UUO. Asam klorogenat memiliki peran sebagai antiinflamasi melalui reduksi ekspresi TNF- α dan COX-2. Asam klorogenat dapat menekan apoptosis dan autofagi, serta meningkatkan proses recovery ginjal¹².

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa pada kelompok yang mendapatkan asam klorogenat memiliki ekspresi mRNA TLR-4, mRNA MCP-1, jumlah makrofag M1 lebih rendah dan jumlah makrofag M2 yang lebih tinggi dibandingkan kelompok yang tidak mendapat[askan asam klorogenat. Pada penelitian berikutnya dapat dilakukan pemeriksaan imunohistokimia dengan cara menggunakan penanda makrofag M1 lainnya seperti F4/80.

DAFTAR PUSTAKA

1. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI. *Riset Kesehatan Dasar*. Jakarta:

- Kementerian Kesehatan RI. 2013.
2. Uceró, A.C., Benito-Martin, A., Izquierdo, M.C., Sanchez-Nino, M.D., Sanz, A., Ramos, A.M., *et al.* Unilateral Ureteral Obstruction: Beyond Obstruction. *Int Urol Nephrol.* 2014; 46(4): 765–776.
 3. Wang, W., Zhou, P. H., Xu, C. G., Zhou, X. J., Hu, W., Zhang, J. Baicalein attenuates renal fibrosis by inhibiting inflammation via down-regulating NF- κ B and MAPK signal pathways. *J Mol Histol.* 2015; 46(3): 283–290.
 4. Efstratiadis, G., Divani, M., Katsioulis, E., Vergoulas, G. Renal Fibrosis. *Hippokratia.* 2009; 13(4): 224-228.
 5. Eddy, A. Overview of the cellular and molecular basis of kidney fibrosis. *Kidney Int Suppl.* 2014; 4(1): 2–8.
 6. Yiu, W. H., Lin, M., Tang, S. C. W. Toll-like receptor activation: from renal inflammation to fibrosis. *Kidney Int suppl.* 2014; 4(1): 20–25.
 7. Pulskens, W. P., Rampanelli, E., Teske, G. J., Butter, L. M., Claessen, N., Luirink, I. K., Van der Poll, T., *et al.* TLR4 promotes fibrosis but attenuates tubular damage in progressive renal injury. *J Am Soc Nephrol.* 2010; 21(8): 1299-1308.
 8. Skuginna, V., Lech, M., Allam, R., Ryu, M., Clauss, S., Susanti, H. E., *et al.* Toll-like receptor signaling and SIGIRR in renal fibrosis upon unilateral ureteral obstruction. *PloS One.* 2014; 6(4): 19204.
 9. Adhyatmika, A., Putri, K. S. S., Beljaars, L., Melgert, B. N. The elusive antifibrotic macrophage. *Front Med.* 2015; 2: 81.
 10. Cao, Q., Wang, Y., Harris, D. C. H. Macrophage heterogeneity, phenotypes, and roles in renal fibrosis. *Kidney Int Suppl.* 2014; 4(1): 16-19.
 11. Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., *et al.* In Vitro and in Vivo Antioxidant Properties of Chlorogenic Acid and Caffeic Acid. *Int J Pharm.* 2011; 403(1-2): 136-138.
 12. Domitrović, R., Cvijanović, O., Šušnić, V., Katalinić, N. Renoprotective mechanisms of chlorogenic acid in cisplatin-induced kidney injury. *Toxicology.* 2014; 324: 98–107.
 13. Pan, B., Liu, G., Jiang, Z., Zheng, D. Regulation of renal fibrosis by macrophage polarization. *Cell Physiol Biochem.* 2015; 35(3): 1062-1069.
 14. Gueteras, R., Flaquer, M., Cruzado, J. M. Macrophage in chronic kidney disease. *Clin Kidney J.* 2016; 4:18.
 15. Kim, M. J., Turner, C. M., Hewitt, R., Smith, J., Bhangal, G., Pusey, C., *et al.* Exaggerated renal fibrosis in P2X4 receptor-deficient mice following unilateral ureteric obstruction. *Nephrol Dial Transplant.* 2014; 29(7): 1350-1361.
 16. O’Hayre, M., Salanga, C. L., Handel, T. M., Allen, S. J. Chemokines and cancer: migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment. *Biochem J.* 2008; 409(3): 635–649.
 17. Shen, B., Liu, X., Fan, Y., Qiu, J. Macrophage regulate renal fibrosis through modulating TGF β superfamily signaling. *Inflammation.* 2014; 37: 2076-2084.
 18. Sica, A., Mantovani, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest.* 2012; 122(3): 787-795.
 19. Ma, Y., Gao, M., Liu, D. Chlorogenic acid improves high fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance in mice. *Pharm Res.* 2015; 32(4):

- 1200-1209.
20. Ohkawara, T., Takeda, H., Nishihira, J. Protective effect of chlorogenic acid on the inflammatory damage of pancreas and lung in mice with L-arginine-induced pancreatitis. *Life Sci.* 2017; 91-96.
 21. Naveed, M., Hejazi, V., Abbas, M., Kamboh A. A., Khan, G. J., Shumzad, M., et al. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomed pharmacother.* 2018; 97: 67-74.
 22. Shi, H., Dong, L., Jiang, J., Zhao, J., Zhao, G., Dang, X., et al. Chlorogenic acid reduces liver inflammation and fibrosis through inhibition of toll-like receptor 4 signaling pathway. *Toxicology.* 2013; 303: 107-114.
 23. de Borst, M. H., Prakash, J., Sandovici, M., Klok, P., Hamming, I., Kok, R. J., et al. c-Jun NH2-terminal kinase is crucially involved in renal tubulo-interstitial inflammation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009; 331(3): 896-905.
 24. Yun, N., Kang, J. W., Lee, S. M. Protective effects of chlorogenic acid against ischemia/reperfusion injury in rat liver; molecular evidence of its antioxidant and anti-inflammatory properties. *J Nutr Biochem.* 2012; 23(10): 1249-1255.