

PENGARUH PEMBERIAN ASAM KLOOROGENAT PADA MENCIT SWISS WEBSTER DENGAN MODEL UNILATERAL URETERAL OBSTRUCTION

Masita Muchtar^{1,2,3*}, Nur Arfian¹, Junaedy Yunus¹

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 Palu

*Corresponding author: Telp: +6282259088183, email: syta.muchtar@gmail.com

ABSTRAK

Penyakit ginjal kronis terlihat dari kerusakan tubular, peradangan dan fibrosis interstisial. Anemia merupakan komplikasi dari gagal ginjal kronis. Transforming growth factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) dan Snail memainkan peran penting dalam fibrosis ginjal. Asam klorogenik memiliki efek renoprotektif dan antifibrotik, namun efek asam klorogenat terhadap kadar hemoglobin, fraksi area fibrotik, ekspresi mRNA TGF- $\beta 1$ dan mRNA koklea masih belum diketahui. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen dengan desain *post-test only* dan 25 ekor mencit *Swiss Webster* jantan dewasa yang dibagi menjadi lima kelompok yaitu SO, U7, U14, UC7 dan UC14. Tingkat hemoglobin diperiksa dengan *hematology analyzer*, proporsi area fibrotik diwarnai dengan *Sirius Red*. mRNA TGF- $\beta 1$ dan mRNA siput dianalisis dengan RT-PCR. Data dikuantifikasi dengan ImageJ dan diproses dengan SPSS. Kelompok yang diinduksi UUO tanpa pemberian asam klorogenat menunjukkan hemoglobin lebih rendah, area fibrotik lebih rendah, ekspresi TGF- $\beta 1$ dan mRNA etana lebih tinggi dibandingkan kelompok dengan nilai $p < 0,005$, kelompok yang diinduksi UUO dan diberi asam klorogenik mencapai kadar hemoglobin lebih tinggi, fraksi area serat lebih tinggi, ekspresi TGF- $\beta 1$ dan mRNA koklea lebih rendah daripada kelompok U14, $p < 0,005$. Pemberian asam klorogenik menunjukkan kadar hemoglobin lebih tinggi, proporsi area fibrotik, dan ekspresi mRNA TGF- $\beta 1$ dan mRNA siput lebih rendah daripada kelompok yang tidak menerima asam klorogenat.

Kata Kunci: *Unilateral Ureteral Obstruction (UUO)*, asam klorogenat, kadar hemoglobin

ABSTRACT

Chronic kidney failure cause renal fibrosis that is characterized by tubular injury, inflammation, and interstitial fibrosis. Anemia is one complications of chronic kidney failure. Transforming Growth Factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) and Snail are important in renal fibrosis. Chlorogenic acid have been known renoprotective and antifibrotic effects, however the effect of chlorogenic acid on hemoglobin level, fibrosis area fraction, TGF- $\beta 1$ and Snail mRNA expression were still unknown. To assess the effects of chlorogenic acid administration in preventing renal fibrosis in mice with unilateral ureteral obstruction models. This was a quasi experimental research with post test only group design. Subjects were 25 of male adult Swiss Webster mice. Subject divided into 5 group: SO) U7, U14, UC7 and UC14. Hemoglobin levels examined by hematology analyzer, and fibrosis area fractions with Sirius Red staining. TGF- $\beta 1$ and Snail mRNA expression examined with RT-PCR. The data quantified with ImageJ software, then processed with SPSS. UUO induced group without chlorogenic acid showed lower hemoglobin level, higher fibrosis, TGF- $\beta 1$ and Snail mRNA expression compared to control group, $p < 0.005$. Chlorogenic acid groups had higher hemoglobin level, lower fibrosis, TGF- $\beta 1$

and Snail mRNA expression compared to U14 group, $p < 0.005$. Chlorogenic acid administration showed higher hemoglobin levels, lower TGF- β 1 and Snail mRNA expression compared to group without chlorogenic administration.

Keywords: *Unilateral Ureteral Obstruction (UUO), Chlorogenic Acid, Hemoglobin Level*

PENDAHULUAN

Gagal Ginjal Kronik (GGK) merupakan masalah kesehatan global dengan peningkatan prevalensi, tingkat morbiditas, mortalitas, dan biaya yang tinggi serta prognosis yang buruk. Prevalensi global GGK pada orang dewasa 10,4% pada pria dan 11,8% wanita berdasarkan data tahun 2010¹. Penyakit ginjal kronis menjadi urutan ke-19 penyebab utama kematian global di tahun 2004². Menurut hasil *Global Burden of Disease* tahun 2015, GGK merupakan penyebab kematian peringkat ke-18 di dunia tahun 2010 dan meningkat menjadi urutan ke-12 pada tahun 2015 sedangkan di Indonesia, perawatan penyakit ginjal merupakan rangking kedua terbesar dari Badan Penyelenggara Jaminan Sosial (BPJS) kesehatan setelah penyakit jantung³. Prevalensi anemia meningkat sesuai dengan stadium Gagal Ginjal Kronik (GGK), dari 8,4% pada stage 1 menjadi 53,4% pada stage 5. Sebanyak 22,8% pasien GGK dengan anemia yang dirawat yaitu sebanyak 14,6% pasien GGK pada stadium 1-2 dan 26,4% pada stadium 3-4⁴.

Unilateral Ureteral Obstruction (UUO) telah menjadi model penting untuk mempelajari mekanisme fibrosis ginjal serta digunakan untuk mengevaluasi dampak terapeutik potensial untuk memperbaiki penyakit pada ginjal⁵. Pada rentang 14 hari dapat terjadi berbagai keadaan patologis, sehingga menjadikannya model studi yang menarik untuk diteliti. Fibrosis ginjal adalah penyebab utama dari terjadinya penyakit ginjal kronik, setelah terjadi cedera ginjal akut. Mekanisme perbaikan jaringan normal seringkali bisa mengembalikan fungsi ginjal. Penyakit ginjal kronik yang ditandai dengan adanya *remodelling* organ dan jaringan parut atau fibrosis⁶. Fibrosis didefinisikan sebagai pertumbuhan yang berlebihan, pengerasan,

dengan atau tanpa jaringan parut pada berbagai jaringan yang disebabkan oleh kelebihan pengendapan komponen matriks ekstraseluler termasuk kolagen. Hasil akhir dari reaksi inflamasi kronis hasil akhir dari reaksi inflamasi kronis yang disebabkan oleh berbagai rangsangan termasuk infeksi persisten, reaksi autoimun, respons alergi, kimiawi, radiasi maupun cedera jaringan menyebabkan fibrosi. *Myofibroblast* merupakan mediator sel utama fibrosis yang bila diaktifkan berfungsi sebagai sel penghasil utama kolagen⁷.

Anemia merupakan komplikasi GGK yang sering terjadi, bahkan dapat terjadi lebih awal dibandingkan komplikasi GGK lainnya. Pada orang dengan penyakit ginjal berat atau yang ginjalnya telah diangkat ataupun telah menggunakan hemodialisa, akan menimbulkan anemia berat sebagai hasil dari penurunan produksi eritropoietin⁸. Pada penyakit ginjal kronis, disfungsi fibroblas menyebabkan fibrosis ginjal dan anemia. Anemia pada penyakit ginjal kronis dimediasi oleh berkurangnya produksi eritropoietin yang berasal dari fibroblas, hormon yang merangsang eritropoesis⁹. Eritropoietin (EPO) adalah hormon yang esensial untuk produksi sel darah merah dan produksinya sangat berkurang pada pasien dengan penyakit ginjal kronis¹⁰. Penelitian dengan menggunakan hibridisasi *in situ* dan mencit transgenik mengindikasikan bahwa EPO diproduksi oleh fibroblas interstisial di korteks bagian dalam dan medulla bagian luar dari organ ginjal¹¹.

Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) merupakan sitokin yang berperan sebagai mediator utama pada fibrosis ginjal. Komponen Smads yang berperan pada perkembangan fibrosis ginjal adalah protein Smad2/3¹². *Transforming Growth Factor*

Beta 1 berperan penting dalam *epithelial mesenchymal transition*. Penurunan ekspresi E-cadherin yang menandakan perubahan sel epitel menjadi mesenkimal diatur oleh Snail¹³.

Snail memiliki kemampuan untuk memicu terjadinya perubahan sel epitel menjadi sel mesenkimal dengan sifat bermigrasi. *Epithelial to mesenchymal transition* yang diinduksi Snail disebabkan oleh represi transkripsi E-cadherin. Snail merupakan reseptor E-cadherin yang berfungsi sebagai molekul adhesi dan memegang peranan penting dalam pembentukan dan penjagaan integritas jaringan kompleks yang distimulasi melalui Smad2/3 sehingga Snail akan meningkatkan proliferasi fibroblas menjadi *myofibroblast*, fibronektin dan akumulasi matriks ekstraseluler¹⁴.

Asam klorogenat adalah suatu senyawa yang termasuk kedalam komponen fenolik, mempunyai sifat yang larut dalam air dan terbentuk dari esterifikasi asam *quinic* dan asam *transcinnamic* tertentu seperti asam *kafein*, asam *ferulic* dan asam *pcoumaric*. Manfaat asam klorogenat telah diketahui banyak manfaat diantaranya potensi asam klorogenat sebagai antifibrosis, antioksidan maupun antiinflamasi. Pengobatan asam klorogenat berhasil memperbaiki fungsi ginjal dan kerusakan patologis akibat LPS. Selain itu asam klorogenat mampu melawan dan mereduksi adanya fibrosis pada ginjal dengan menghambat produksi TGF- β 1 dan Snail melalui Smad2/3 sehingga mampu memperbaiki fungsi ginjal¹⁵.

Saat ini belum banyak penelitian yang mengkaji pengaruh asam klorogenat terhadap fibrosis ginjal. Berdasarkan uraian di atas, maka peneliti tertarik untuk mengkaji pengaruh pemberian asam klorogenat pada mencit dengan model UUU terhadap kadar hemoglobin, fraksi area fibrosis, ekspresi

mRNA TGF- β 1 dan ekspresi mRNA Snail pada hewan coba.

METODOLOGI

Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian kuasi eksperimental dengan menggunakan pendekatan *post-test only 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.0495/UN28.1.30/KL/2018 pada tanggal 26 Februari 2018.

Persiapan Unilateral Ureteral Obstruction

Pembedahan dilakukan dengan cara meligasi ureter kanan mencit dianestesi dengan injeksi intra-peritoneal *pentobarbital* 0,1 ml/10gramBB/kali. Tindakan UUU dilakukan dengan cara melakukan insisi pada region *flank* sebelah kanan, kemudian ureter proksimal diikat 2x, setelah itu luka ditutup kembali. Prosedur yang sama dilakukan untuk *sham operation*, kecuali tidak dilakukan pengikatan dan pemotongan ureter.

Perlakuan Hewan Coba

Mencit dikelompokkan menjadi 5 kelompok, kemudian ditimbang berat badannya untuk menentukan dosis asam klorogenat, kemudian diberikan dengan dosis 14 mg/kgBB/hari secara *intraperitoneal* pada mencit sampai 7 dan 14 hari. Adapun pembagian untuk setiap kelompoknya sebagai berikut: kelompok *sham operation* (SO), diinjeksi akuades intraperitoneal selama 14 hari sebagai kontrol; kelompok U7, mencit dengan UUU yang diinjeksi akuades secara intraperitoneal selama 7 hari; kelompok UC7, mencit dengan UUU yang diinjeksi asam klorogenat selama 7 hari; kelompok U14 mencit dengan UUU yang diinjeksi akuades secara intraperitoneal selama 14 hari;

kelompok UC14 mencit dengan UUO yang diinjeksi asam klorogenat selama 14 hari

Prosedur Pengambilan Sampel Darah

Pengambilan sampel darah dilakukan pada hari ke 14 perlakuan. Setelah itu ambil darah 2-3 mL diambil melalui vena retroorbita dengan menggunakan tabung EDTA, kemudian sampel dibawa ke Laboratorium Patologi Klinik RSUD Anutapura Palu.

Pewarnaan Histopatologis Sirius Red

Slide jaringan dipotong dengan ketebalan 4 mm selanjutnya *slide* jaringan dideparanifisasi, dan dicuci dengan PBS. *Slide* jaringan diberikan *Sirius Red working solution* yang terdiri dari 1 mL dan 9 mL asam pikrat hingga menutupi seluruh permukaan jaringan selama 1 jam. Kemudian direndam secara berurutan dalam etanol 100% dan xilena masing-masing sebanyak 3 kali, kemudian dimounting dan diinkubasi selama 24 jam. Fraksi area fibrosis adalah terdapatnya akumulasi matriks ekstraseluler di ruang interstisial tubulus renalis yang berwarna merah dinilai dengan menggunakan pewarnaan *Sirius Red* yang mewarnai kolagen. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x, kuantifikasi fraksi area fibrosis dianalisis menggunakan *software ImageJ*[®].

Ekstraksi RNA, Pembuatan cDNA dan 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).

Pemeriksaan ekspresi TGF- β 1 menggunakan *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)* dengan mengambil cDNA 2 μ L kemudian dicampur dengan *master mix* (dNTP, Taq, dan 10x *buffer*) dan ditambahkan dengan *primer* dari TGF- β 1 (*forward*:

5'-AGAAATGGCGAGTCAGCACCATCAAG-3' dan *reverse*: 5'-GATGGCACATCCACGACCAG-3').

Temperatur *annealing* adalah 54°C sebanyak 35 siklus. *Primer* GAPDH *forward* 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' *reverse* 5'-TTGAGGTGGTTGTGGAAAAG-3'.

Pemeriksaan ekspresi Snail menggunakan *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)* dengan mengambil cDNA 2 μ L kemudian dicampur dengan *master mix* (dNTP, Taq, dan 10x *buffer*) dan ditambahkan dengan *primer* dari Snail (*forward*:

5-AGAAATGCAGTCAGCACCATCAAG-3 dan *reverse*: 5-GATGGCCACATCCACGACCAG-3').

Temperatur *annealing* adalah 53°C sebanyak 35 siklus. *Primer* GAPDH *forward* 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' *reverse* 5'-TTGAGGTGGTTGTGGAAAAG-3'.

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 mRNA TGF- β 1 dan ekspresi mRNA Snail dikuantifikasi dengan analisis densitometri menggunakan *software ImageJ*[®] dan GAPDH digunakan untuk menormalisasi ekspresi.

Analisis Statistik

Data dianalisis dengan menggunakan perangkat lunak SPSS 22 *for Windows*. Uji normalitas data dengan menggunakan

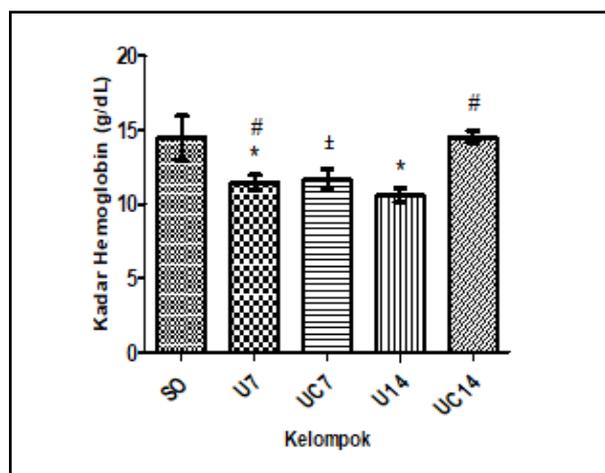
Shapiro-Wilk dilanjutkan dengan *one-way ANOVA* pada variabel kadar hemoglobin dan fraksi area fibrosis serta uji Kruskal-Wallis pada variabel ekspresi mRNA TGF- β 1 dan mRNA Snail.

HASIL DAN PEMBAHASAN

HASIL

Kadar Hemoglobin

Hasil analisis statistik dapat disimpulkan bahwa pada kelompok U7 ($11 \pm 0,50$) dan U14 ($10,58 \pm 0,45$) memiliki kadar hemoglobin yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok SO ($14,46 \pm 1,50$). Pada kelompok UC14 ($14,52 \pm 0,43$) memiliki kadar hemoglobin yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok U14. Kelompok UC14 memiliki kadar hemoglobin yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok U7. Data rerata kadar hemoglobin ditampilkan dalam bentuk diagram batang (Gambar 1).



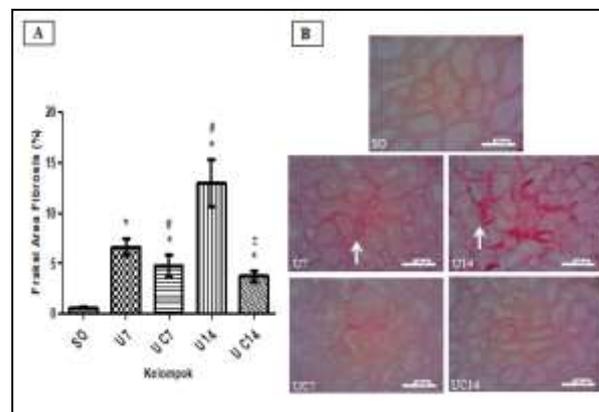
Gambar 1. Diagram batang nilai rerata (\pm SD) kadar hemoglobin. Uji *Kruskal Wallis* ($p=0,001$)

Keterangan: *= $p < 0,05$ vs SO, #= $p < 0,05$ vs U14, \pm = $p < 0,05$ vs UC14

Fraksi Area Fibrosis

Pada kelompok U7 ($6,62 \pm 0,81$) dan U14 ($12,98 \pm 2,31$) fraksi area fibrosis lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok SO ($0,62 \pm 0,11$). Pada kelompok UC14

($3,72 \pm 0,54$) fraksi area fibrosis lebih rendah dibandingkan dengan kelompok U7 dan U14. Fraksi area fibrosis pada kelompok UC7 ($4,76 \pm 1,03$) lebih rendah dibandingkan kelompok U7 dan U14. Data rerata fraksi area fibrosis ditampilkan dalam bentuk diagram batang (Gambar 2).



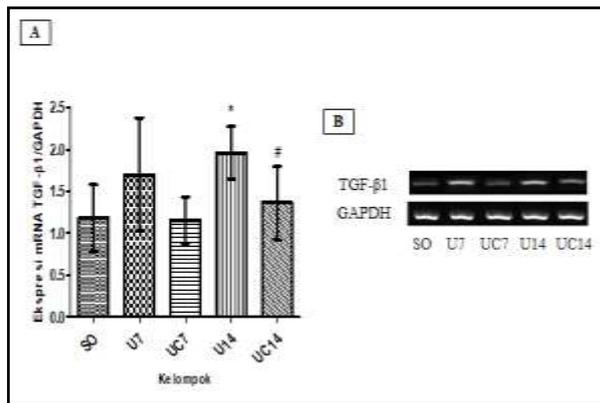
Gambar 2. A Diagram batang rerata fraksi area fibrosis. Uji *Kruskal Wallis* ($p=0,000$).

Keterangan: *= $p < 0,05$ vs SO, #= $p < 0,05$ vs U7, \pm = $p < 0,05$ vs U14 B. Gambaran mikroskopis ginjal dengan pewarnaan *Sirius Red*.

Keterangan: Tanda panah menunjukkan fibrosis di ruang interstitial tubulus ginjal terlihat berwarna merah.

Ekspresi mRNA TGF- β 1

Pada kelompok U14 ($1,96 \pm 0,32$) ekspresi mRNA TGF- β 1 lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok SO ($1,18 \pm 0,39$). Pada kelompok UC7 ($1,16 \pm 0,28$) ekspresi mRNA TGF- β 1 lebih rendah dibandingkan dengan kelompok U7 ($1,70 \pm 0,68$) dan ekspresi mRNA TGF- β 1 pada kelompok UC14 ($1,36 \pm 0,44$) lebih rendah dibandingkan dengan kelompok U14. Data rerata ekspresi mRNA TGF- β 1 ditampilkan dalam bentuk diagram batang (Gambar 3).

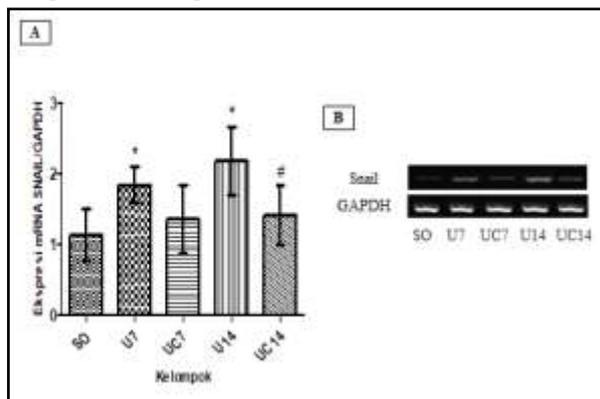


Gambar 3. **A.** Diagram batang rerata ekspresi mRNA TGF-β1. Nilai p menggunakan uji *one-way Anova*, $p=0,040$.

Ket: *= $p<0,05$ vs SO, #= $p<0,05$ vs U14, dan **B.** Gambaran *band* ekspresi mRNA TGF-β1 dan GAPDH

Ekspresi mRNA Snail

Pada kelompok U7 ($1,84\pm 0,25$) dan U14 ($2,18\pm 0,49$) ekspresi mRNA Snail lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok SO ($1,13\pm 0,37$). Pada kelompok UC14 ekspresi mRNA Snail lebih rendah dibandingkan dengan kelompok U14. Data rerata ekspresi mRNA Snail ditampilkan dalam bentuk diagram batang (Gambar 4).



Gambar 4. **A.** Diagram batang rata-rata ekspresi mRNA Snail. Nilai p menggunakan uji *one-way Anova*, $p=0,004$.

Ket: *= $p<0,05$ vs SO, **= $p<0,05$ vs SO, #= $p<0,05$ vs U14 dan

B. Gambaran *band* ekspresi mRNA Snail dan GAPDH

AGUSTUS 2023

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini kadar hemoglobin pada kelompok U7 dan U14 lebih rendah dibandingkan dengan kelompok SO, hal ini menunjukkan bahwa UUU dapat menginduksi terjadinya kadar hemoglobin yang rendah. Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa pada penyakit ginjal kronis, disfungsi fibroblas menyebabkan fibrosis ginjal dan anemia. Anemia pada penyakit ginjal kronis dimediasi oleh berkurangnya produksi eritropoietin yang berasal dari fibroblas, hormon yang merangsang eritropoiesis⁹. Eritropoietin (EPO) adalah hormon yang esensial untuk produksi sel darah merah dan produksinya sangat berkurang pada pasien dengan penyakit ginjal kronis¹⁰. Penelitian dengan menggunakan hibridisasi *in situ* dan mencit transgenik mengindikasikan bahwa EPO diproduksi oleh fibroblas interstitial di korteks bagian dalam dan medula bagian luar dari organ ginjal¹¹.

UUU dapat memberikan gambaran kerusakan dan apoptosis tubulus, fibrosis serta inflamasi di interstitial. Selama perlakuan ini kerusakan sel-sel nefron dimulai dengan adanya peningkatan tekanan hidrostatik intratubuler, disertai dengan keadaan iskemia. Keadaan tersebut dapat memicu kematian sel tubulus, yang bisa diamati setelah 24 jam sejak UUU dilakukan¹⁶. Pada penelitian ini fraksi area fibrosis pada kelompok U7 dan U14 lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok SO. Hal tersebut yang mendasari bahwa UUU mampu menginduksi terjadinya fibrosis. Fraksi area fibrosis pada kelompok UC7 lebih rendah dibandingkan dengan kelompok U7. Hal tersebut dilakukan untuk memicu progresi fibrosis secara cepat. Waktu dua minggu sudah dapat melihat kemunculan fibrosis setelah cedera ginjal¹⁷. Secara histologis penanda yang khas dan sesuai dengan keadaan gagal ginjal kronik tersebut, didapatkan setelah 1-2 minggu setelah UUU¹⁶. Pada penelitian ini, ekspresi mRNA

TGF- β 1 pada kelompok U7 dan U14 lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok SO, sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa peningkatan ekspresi TGF- β pada cedera ginjal akut bersifat sementara dan berfungsi untuk menginduksi perbaikan ginjal¹⁸. Inflamasi yang terjadi pada hari ke-7 berkaitan dengan adanya TGF- β 1 sebagai modulator Snail dan menyebabkan peningkatan protein Snail sebagai faktor transkripsi dari E-cadherin. Pengikatan atau ligasi ureter unilateral pada hewan coba dapat mengakibatkan fibrosis ginjal, sesuai dengan penelitian yang dilakukan penelitian sebelumnya yang menjelaskan proses fibrosis dianggap sebagai respon maladaptif terhadap suatu cedera yang akan berakhir pada suatu keadaan fibrosis ginjal yang *irreversible*¹⁹. Pada fibrosis ginjal yang ditandai dengan adanya akumulasi miofibroblas yang menyebabkan deposisi matriks ekstraseluler, sehingga terjadi disfungsi fibroblas dalam memproduksi EPO dan menyebabkan pembentukan eritropoiesis menjadi terganggu⁹. Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, yaitu kelompok dengan perlakuan pemberian asam klorogenat memiliki kadar hemoglobin yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok tanpa pemberian asam klorogenat sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa asam klorogenat itu sendiri dapat mencegah anemia dan kerusakan mineral dengan cara memperbaiki stres oksidatif dan mencegah terjadinya apoptosis²⁰.

Pada fibrosis interstitial diperkirakan berbagai faktor berperan dalam proses terjadinya proses tersebut, seperti stres oksidatif dan inflamasi²¹. Banyak hal yang berperan dalam proses terjadinya fibrosis interstitial, namun yang paling mendominasi adalah TGF- β , angiotensin II, NF κ B, dan TNF- α yang diproduksi oleh sel tubulus dan interstitial ginjal sendiri maupun dari makrofag²². *Transforming Growth Factor Beta* menginduksi fibrosis ginjal melalui jalur

Smad2/3 dengan cara mengaktivasi *myofibroblast*, meningkatkan produksi matriks ekstrasel, dan menghambat degradasi ekstrasel²³. Sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa peningkatan ekspresi TGF- β pada cedera ginjal bersifat sementara dan berfungsi untuk menginduksi perbaikan ginjal. Berbeda dengan ekspresi TGF- β pada gagal ginjal kronis yang akan terus tinggi¹⁸. Namun, proses perbaikan ginjal seringkali bersifat maladaptif yang nantinya akan berujung pada fibrosis dan penyakit ginjal kronis. Hal ini terjadi jika perbaikan ginjal tidak sempurna, terjadi inflamasi tubulointerstisial yang berlangsung secara terus menerus, terjadi proliferasi fibroblas, dan deposisi matriks ekstrasel yang berlebihan sehingga terbentuk fibrosis²⁴.

Pada penelitian ini ekspresi mRNA TGF- β 1 pada kelompok yang diberi asam klorogenat lebih rendah dibandingkan dengan kelompok yang tidak diberi asam klorogenat. Ekspresi mRNA TGF- β yang lebih rendah dikarenakan adanya pengaruh penghambatan dari asam klorogenat terhadap ekspresi TGF- β 1 menurunkan produksi ROS, radikal bebas sehingga menghambat terjadinya fibrosis²⁵. Menariknya, aktivitas TGF- β 1 juga dipengaruhi oleh aktivitas dari TLR4 melalui interaksi sinyal proinflamatori dan profibrogenik. Oleh karena itu, ketika TLR4 sudah dihambat terlebih dahulu maka secara otomatis ekspresi mRNA TGF- β 1 ikut dihambat²⁶. Disamping itu TGF- β 1 juga menstimulasi produksi faktor pertumbuhan (*growth factor*) seperti *basis Fibroblast Growth Factors (bFGF)* dan *Platelet Derived Growth Factor (PDGF)* yang juga menstimulasi pembentukan matriks ekstraseluler²⁷. Hal tersebut disebabkan karena fungsi asam klorogenat sebagai antioksidan atau modulator jaringan dan TGF- β 1 sebagai faktor pertumbuhan dalam memodulasi matriks ekstraseluler saling meningkatkan sehingga tampak lebih tinggi²⁸. Berdasarkan hal tersebut, pemberian asam

klorogenat diperkirakan memiliki efek untuk mengurangi fibrosis pada ginjal dengan menurunkan TGF- β 1 dan mengurangi inflamasi lebih cepat sehingga tidak terjadi inflamasi kronis yang berujung pada fibrosis ginjal dan asam klorogenat mampu menurunkan ekspresi mRNA TGF- β 1^{29,30,31}. Ekspresi mRNA TGF- β 1 yang lebih rendah tersebut disebabkan karena asam klorogenat terbentuk dari esterifikasi asam *quinic* dan asam *transcinnamic* yang dapat menghambat perkembangan fibrosis ginjal. Menurut Shi *et al.* (2015) bahwa asam klorogenat mampu menghambat fibrosis dengan cara menurunkan ekspresi TGF- β 1, produksi ROS, dan radikal bebas²⁵.

Snail merupakan reseptor E-Cadherin dan berperan penting pada fibrosis ginjal. Hasil penelitian ekspresi mRNA Snail pada kelompok U7 dan U14 dibandingkan dengan kelompok SO menunjukkan perbedaan yang signifikan. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa Snail akan terekspresi langsung dan meningkat pada ginjal yang mengalami obstruksi pada hari pertama setelah dilakukan UUO^{32,33}. Pada penelitian ini, ekspresi mRNA Snail pada kelompok UC14 lebih rendah dibandingkan dengan kelompok U14. Hal ini menunjukkan bahwa ginjal yang mengalami obstruksi, akan terjadi peningkatan ekspresi mRNA Snail yang akan terekspresi pada hari ke-7 paska UUO pada mencit dan menginduksi terjadinya fibrosis^{34,35}. Hal ini menunjukkan bahwa pada ginjal yang mengalami obstruksi, terjadi peningkatan ekspresi mRNA Snail yang akan menginduksi terjadinya fibrosis³⁴. Pembentukan miofibroblas yang ditandai dengan deposisi matriks ekstraseluler merupakan faktor kunci terjadinya gagal ginjal kronis yang akan menyebabkan stadium terminal dari gagal ginjal berupa fibrosis ginjal²⁷. Pemberian asam klorogenat akan meningkatkan faktor transkripsi yang berperan dalam ekspresi enzim antioksidan dengan cara mengeliminasi radikal bebas dan

menjadi senyawa yang lebih mudah untuk distabilisasi³⁶.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa asam klorogenat dapat memperbaiki kadar hemoglobin yang lebih tinggi, fraksi area fibrosis yang lebih rendah, ekspresi mRNA TGF- β 1 yang lebih rendah, dan ekspresi mRNA Snail yang lebih rendah dibandingkan dengan yang tidak mendapatkan asam klorogenat. Untuk penelitian selanjutnya, perlu dilakukan pengukuran ekspresi mRNA TGF- β 1 dan mRNA Snail menggunakan *Real Time Polymerase Chain Reaction* yang memiliki sensitivitas dan spesifisitas lebih tinggi dan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh asam klorogenat terhadap ekspresi mRNA TGF- β 1 yang lebih spesifik terhadap jalur Smad2/3 untuk mencegah fibrosis ginjal.

DAFTAR PUSTAKA

1. Cernaro V, Santoro D, Lacquaniti A, Costantino G, Visconti L, Buemi A. Phosphate binders for the treatment of chronic kidney disease: role of iron oxyhydroxide. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 2016; 19(9): 11–19.
2. Ayodele OE & Alebiosu CO. Burden of chronic kidney disease: an international perspective. *Adv Chronic Kidney Dis* 2010; 17(3): 215–224.
3. Pusat Data dan Informasi Kemenkes RI. Situasi Penyakit Ginjal Kronis. Jakarta: Info Datin Kementerian Kesehatan RI, 2017.
4. Stauffer ME & Fan T. Prevalence of anemia in chronic kidney disease in the united states. *PloS one* 2014; 9(1): 84943.
5. Klahr S & Morrissey J. Obstructive nephropathy and renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 283(5): 861-875.

6. Hewitson TD. Fibrosis in the kidney: is a problem shared a problem halved? *Fibrogenesis Tissue Repair* 2012; 5(1): 14.
7. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 2008; 214(2): 199–210.
8. Guyton AC & Hall JE. *Physiology Review*. 3th ed. Philadelphia: Elsevier Saunder, 2016.
9. Asada N, Takase M, Nakamura J, Oguchi A, Asada M, Suzuki N. Dysfunction of fibroblasts of extrarenal origin underlies renal fibrosis and renal anemia in mice. *J Clinical Invest* 2011; 121(10): 3981–3990.
10. Erslev AJ & Besarab A. Erythropoietin in the pathogenesis and treatment of the anemia of chronic renal failure. *Kidney Int* 1997; 51(2): 622-630.
11. Obara N, Suzuki N, Kim K, Nagasawa T, Imagawa S, Yamamoto M. Repression via the GATA box is essential for tissue-specific erythropoietin gene expression. *Blood* 2009; 111(10): 5223-5232.
12. Hu Q, Gao L, Peng B, Liu X. Baicalin and baicalein attenuate renal fibrosis in vitro via inhibition of the TGF- β 1 signaling pathway. *Exp Ther Med* 2017; 14(4): 3074–3080.
13. Horiguchi K, Shirakihara T, Nakano A, Imamura T, Miyazono K, Saitoh M. Role of ras signaling in the induction of snail by transforming growth factor- β . *J Biol Chem* 2009; 284(1): 245–253.
14. Smith BN & Odero-Marrah VA. The role of snail in prostate cancer. *Cell Adh Migr* 2012; 6(5): 433–441.
15. Farah A, Monteiro M, Donangelo CM, Lafay S. Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans. *J Nutr* 2008; 138(12): 2309–2315.
16. Xu Y, Ruan S, Wu X, Chen HH, Zheng K, Fu B. Autophagy and apoptosis in tubular cells following unilateral ureteral obstruction are associated with mitochondrial oxidative stress. *Int J Mol Med* 2013; 3(1): 628-636.
17. Zhang Y, Li Q, Liu D, Huang Q, Cai G, Cui S. GDF11 improves tubular regeneration after acute kidney injury in elderly mice. *Sci Rep* 2016; 5(6): 34624-34625.
18. Jiang YS, Jiang T, Huang B, Chen PS, Ouyang J. Epithelial-mesenchymal transition of renal tubules: divergent processes of repairing in acute or chronic injury? *Med Hypotheses* 2013; 81(1): 73-75.
19. Chevalier RL, Forbes MS, Thornhill, BA. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney Int* 2009; 75(11): 1145-1154.
20. Koriem KMM, Arbid MSS, Gomma NE. The role of chlorogenic acid supplement in anemia and mineral disturbances induced by 4-tert-octylphenol toxicity. *J Diet Suppl* 2018; 15(1): 55-71.
21. Grande MT, Sanchez-Laorden B, Lopez-Blai C, De-Frutos CA, Boutet A, Arevalo M. Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease. *Nat Med* 2015; 21(9): 989–997.
22. Singh I, Strandhoy, Assimos. *Pathophysiology of Urinary Tract Obstruction*. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2012.
23. Meng XM., Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol* 2016; 12(6): 325-338.
24. Bounventre JV & Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest* 2011; 121(1): 4210-4221.
25. Shi H, Shi A, Dong L, Lu X, Wang Y, Zhao J. Chlorogenic acid protects againts

- liver fibrosis in vivo and in vitro through inhibition of oxidative stress. *Clin Nut J* 2015; 35(1): 1366-1377.
26. Seki E, Minicis SD, Osterreicher CH, Kluwe J, Osawa Y, Brenner DA. TLR enhances TGF- β signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med J* 2007; 11(11): 1324-1332.
 27. Trihono PP. Peran transforming growth factor-beta1 pada penyakit ginjal. *Sari Pediatri* 2011; 13(1): 49-54.
 28. Chen W, Liou S, Tzeng T, Li S, Lium I. Effect of topical application of chlorogenic acid on wound healing in rats. *Planta Med J* 2013; 79(1): 616-621.
 29. Domitrović R, Cvijanović O, Šušnić V, Katalinić N. Renoprotective mechanism of chlorogenic acid in cisplatin-induced kidney injury. *Toxicology* 2014; 3(24): 98-107.
 30. Lou J, Xiaoxia G, Yinghua X, Jing C, Wei LV, Yan Z. Chlorogenic acid slows down proteinuria and renal fibrosis in 5/6 nephrectomized rats by anti-oxidation and inhibiting accumulation of extracellular matrix. *Int J Clin Exp Med* 2016; 9(8): 1579-15727.
 31. Ye HY, Li ZY, Zheng Y, Chen Y, Zhou ZH, Jin J. The attenuation of chlorogenic acid on oxidative stress for renal injury in streptozotocin-induced diabetic nephropathy rats. *Arch Pharm Res* 2016; 39(7): 989-997.
 32. Lange-Sperandio B, Trautmann A, Eickelberg O, Jayachandran A, Oberle S, Schmidutz F. Leukocytes induce epithelial to mesenchymal transition after unilateral ureteral obstruction in neonatal mice. *Am J Pathol* 2007; 171(3): 861-871.
 33. Yoshino J, Monkawa T, Tsuji M, Inukai M, Itoh H, Hayashi M. Snail1 is involved in the renal epithelial-mesenchymal transition. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 362(1): 63-68.
 34. Nieto MA. The snail superfamily of zinc finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3(3): 155-166.
 35. Sato M, Muragaki Y, Saika S, Roberts AB, Ooshima A. Targeted disruption of TGF- β 1/ Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *J Clin Invest* 2003; 112(10): 1486-1494.
 36. Liang N & Kitts DD. Role of chlorogenic acids in controlling oxidative and inflammatory stress conditions. *Nutrients* 2015; 8(1): 16.