

Efek Penambahan Asam Rosmarinat pada Tikus Diabetes yang Diberikan Telmisartan terhadap Penurunan Ekspresi NF- κ B Glomerulus

The Additive Effect of Rosmarinic Acid for The Reduction of Glomerular NF- κ B Expression in Diabetes Rat that was given Telmisartan

Mochamad Fachruraza¹, Nur Samsu², Achmad Rudijanto²

¹Program Studi Pendidikan Dokter Spesialis I, Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Rumah Sakit Umum Daerah dr.Saiful Anwar Malang

²Divisi Ginjal dan Hipertensi, SMF Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Rumah Sakit Umum Daerah dr.Saiful Anwar Malang

³Divisi Endokrinologi, Metabolik dan Diabetes, SMF Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Rumah Sakit Umum Daerah dr.Saiful Anwar Malang

Korespondensi:

Mochamad Fachruraza. Program Studi Pendidikan Dokter Spesialis I, Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Rumah Sakit Umum Daerah dr. Saiful Anwar Malang, Jawa Timur. Email: dr.edja84@gmail.com

ABSTRAK

Pendahuluan. Nefropati diabetik merupakan komplikasi diabetes yang sering terjadi, salah satunya akibat peningkatan radikal bebas melalui aktivasi NF- κ B serta Angiotensin II. Asam rosmarinat bermanfaat sebagai antioksidan dan antiinflamasi, sedangkan telmisartan merupakan agonis parsial PPAR- γ yang memiliki efek antifibrotik. Penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi efek asam rosmarinat dan telmisartan terhadap penurunan ekspresi subunit p65 NF- κ B pada glomerulus tikus diabetes.

Metode. Penelitian eksperimental laboratorium, *post-test only controlled group* menggunakan tikus *Rattus norvegicus* yang terbagi menjadi kelompok kontrol negatif, kontrol positif, asam rosmarinat 75 mg/kg/hari, telmisartan 1 mg/kg/hari, serta kombinasi asam rosmarinat 75 mg/kg/hari dan telmisartan 1 mg/kg/hari setiap hari yang dibedah pada minggu ke-8 setelah tikus menjadi diabetes. Gula darah lebih dari 270 mg/dL menunjukkan telah terjadi diabetes pada tikus. Pengukuran albuminuria dengan metode ELISA dan ekspresi subunit p65 NF- κ B dengan metode imunofluoresensi.

Hasil. Didapatkan rerata ekspresi subunit p65 NF- κ B pada kontrol negatif 519,70 (simpang baku [SB] 158,12) *arbitrary unit*, kontrol positif 702,19 (SB 189,69) *arbitrary unit*, kelompok asam rosmarinat 631,19 (SB 119,21) *arbitrary unit*, kelompok telmisartan 355,68 (SB 44,71) *arbitrary unit*, kombinasi asam rosmarinat dan telmisartan 572,37 (SB 98,09) *arbitrary unit* dengan $p < 0,001$. Uji *post hoc test* menunjukkan perbedaan rerata ekspresi subunit p65 NF- κ B yang signifikan antara kontrol positif dengan kelompok telmisartan ($p < 0,001$). Namun, tidak didapatkan perbedaan rerata ekspresi subunit p65 NF- κ B yang signifikan antara kontrol positif dengan asam rosmarinat ($p = 1,000$) maupun dengan kombinasi asam rosmarinat dan telmisartan.

Simpulan. Didapatkan penurunan ekspresi subunit p65 NF- κ B pada kelompok telmisartan, namun penambahan asam rosmarinat pada tikus diabetes yang diberikan telmisartan tidak dapat menurunkan ekspresi subunit p65 NF- κ B pada level setara dengan kontrol negatif.

Kata Kunci: Asam rosmarinat, ekspresi subunit p65 NF- κ B, nefropati diabetik, telmisartan

ABSTRACT

Introduction. Diabetic nephropathy is one of the common complications of diabetes, which one of its causes is the increase of free radicals through the activation of NF- κ B and Angiotensin II. Rosmarinic acid has the activity as the anti-oxidant and anti-inflammatory, and the telmisartan is the partial PPAR- γ agonist that has the anti-fibrotic effect. This study aimed to identify the effect of rosmarinic acid and telmisartan in the reduction of subunit p65 NF- κ B expression on the glomerular diabetes rat.

Methods. An experimental study with a *post-test only controlled group* was conducted in a group of rats (*Rattus norvegicus*). Rats were randomly divided into five groups ($n = 3-4$ per group): three treatment groups (group 1: rosmarinic acid 75 mg/kg/day; group 2: telmisartan 1 mg/kg/day, group 3: combination of rosmarinic acid 75 mg/kg/day and telmisartan 1mg/kg/day per day), and two control groups (negative and positive control group). After eight weeks, rats were dissected. Blood

sugar more than 270 mg/dl confirmed that the rats in diabetes state. The measurement of albuminuria was done using ELISA and the expression of subunit p65 NF- κ B using the immunofluorescence method.

Results. The expression of subunit p65 NF- κ B in negative control group was 519.70 (SD 158.12), 702.19 (SD 189.69) in positive control group, 631.19 (SD 119.21) in the rosmarinic acid group, 355.68 (SD 44.71) in the telmisartan group, and 572.37 (SD 98.09) in the combination group ($p < 0.001$). The post hoc test showed that the mean value of subunit p65 NF- κ B expression was significantly different between the positive control group and the telmisartan group ($p < 0.001$). But, there was no significant mean difference of subunit p65 NF- κ B expression between the positive control group and the rosmarinic acid group ($p = 1.000$), as well as between the combination rosmarinic acid and telmisartan group.

Conclusion. The addition of telmisartan can reduce expression of the subunit p65 NF- κ B. However, adding the rosmarinic acid in diabetes rats given telmisartan did not reduce the expression of subunit p65 NF- κ B in the same level with the negative control group.

Keywords: Diabetic nephropathy, rosmarinic acid, subunit p65 NF- κ B expression, telmisartan

PENDAHULUAN

Prevalensi diabetes melitus (DM) semakin meningkat di dunia, seiring dengan peningkatan komplikasi ginjal pada DM. Kondisi hiperglikemia kronik diketahui dapat menginduksi stres oksidatif melalui produksi spesies oksigen reaktif/*reactive oxygen species* (ROS), selanjutnya ROS yang berlebihan mengaktifkan angiotensin II dan faktor transkripsi NF- κ B. Peningkatan aktivasi NF κ B menstimulasi transkripsi target gennya yaitu CTGF, TGF- β , VEGF, Ang II, ICAM-1, VCAM-1, MCP-1, sitokin proinflamasi IL-1 α , IL-6, TNF- α , dan AGE.¹ Kesemuanya merupakan faktor yang memicu terjadinya nefropati diabetik (ND), yang dimanifestasikan dengan ND adalah glomerulosklerosis, penebalan membran basement glomerulus (MBG), hipertrofi glomerulus, ekspansi sel mesangial, disfungsi dan hilangnya podosit, dan fibrosis tubulointersisiel.²

Spesies oksigen reaktif terbukti mempunyai peran penting terhadap induksi dan progresivitas ND sehingga terapi dengan pendekatan radikal tampaknya dapat memperbaiki masalah ini.³ Akan tetapi, untuk mencapai tujuan ini diperlukan antioksidan yang multi-properti, baik tunggal maupun kombinasi yang mempunyai kapasitas antioksidan yang kuat, mempunyai efek anti-inflamasi, waktu paruh yang lama, mempunyai permeabilitas yang tinggi terhadap mitokondria dan dapat memperbaiki aktivitas enzim antioksidan tubuh.⁴ Berdasarkan data yang telah ada, asam rosmarinat tampaknya memberikan harapan pada tata laksana ND, berdasar pada kapasitas utamanya sebagai antioksidan dan anti-inflamasi juga mampu menurunkan NF- κ B.^{5,6}

Sistem renin-angiotensin terbukti memainkan peran penting dalam progresivitas penyakit ginjal. Pada sel podosit terdapat komponen sistem renin-angiotensin-aldosteron (SRAA) serta mengekspresikan reseptor SRAA, termasuk reseptor angiotensin II (Ang II). Penghambat SRAA telah terbukti menghambat jejas terhadap podosit pada berbagai penyakit glomerulus.⁷ Penelitian sebelumnya menunjukkan reseptor Ang II antagonis berhubungan

dengan penurunan aktivasi subunit p65 NF- κ B. Di antara *angiotensin receptor blockers* (ARB) yang ada, telmisartan merupakan ARB yang paling lipofilik, mempunyai waktu paruh yang lama dan afinitas yang selektif dan tinggi pada reseptor AT1. Dari sifat fisikokimianya, telmisartan mempunyai absorpsi pemberian oral dan penetrasi jaringan yang bagus.⁸ Telmisartan merupakan agonis PPAR- γ yang memiliki efek antifibrotik pada model penyakit ginjal kronis non-diabetes atau non-hiperlipidemia sehingga dapat memperbaiki berkembangnya sklerosis. Efek ini terkait dengan penurunan PAI-1 dan TGF- β dan penurunan infiltrasi makrofag dan perlindungan podosit terhadap cedera.⁹ Efek ganda telmisartan pada hambatan reseptor AT1 dan mengaktifkan PPAR- γ diharapkan dapat memberikan hasil terapi yang lebih optimal pada tata laksana ND.

Berdasarkan uraian di atas, maka strategi tata laksana ND dengan penghambatan pada jalur-jalur yang terkait dengan Ang II dan stres oksidatif, tampaknya akan memberikan harapan, karena telah terbukti bahwa penghambatan ND dengan obat tunggal sangat sulit. Oleh karena itu, peneliti tertarik untuk melakukan uji eksperimental penambahan asam rosmarinat pada tikus diabetes yang diberikan telmisartan terhadap penurunan subunit p65 NF- κ B glomerulus.

METODE

Penelitian menggunakan desain eksperimental laboratorium, *post-test only controlled group*. Tikus *Rattus norvegicus* diberikan diet tinggi lemak selama tiga minggu, selanjutnya tikus dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kontrol negatif, kontrol positif, asam rosmarinat, telmisartan, kombinasi asam rosmarinat dan telmisartan. Semua tikus dibedah pada minggu ke-8 setelah tikus dinyatakan diabetes.

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Sampel penelitian adalah

tikus *Rattus norvegicus*, jantan, umur 7-9 minggu, berat 150-170 gram, belum mengalami perlakuan apapun atau belum mendapat asupan bahan kimia apapun, bergerak aktif serta bulu tidak rontok. Penelitian dilakukan pada bulan Agustus 2017 – Mei 2018 dan disetujui oleh komisi etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Induksi diabetes dilakukan dengan cara pemberian diet tinggi lemak pada tikus selama tiga minggu. Pada hari ke 22, tikus dipuasakan selama 6 - 8 jam sebelum pemberian streptozotisin (STZ). Air minum tetap diberikan. Induksi diabetes dilakukan dengan injeksi STZ dosis tunggal 40 mg/kgBB secara intraperitoneal (i.p). Setelah injeksi STZ, tikus mendapatkan diet yang tetap. Gula darah diukur pada 10 hari setelah injeksi STZ. Tikus berkembang menjadi diabetes bila gula darah lebih dari 270 mg/dl (lebih 15 mmol/liter).¹⁰

Selanjutnya, dilakukan pembedahan tikus dengan prosedur yang pertama yaitu menyiapkan media transfer. Selanjutnya, berat badan tikus ditimbang. Tikus dieuthanasia menggunakan dislokasi leher. Tikus diposisikan pada papan bedah dan difiksasi pada papan menggunakan pin. Dilakukan insisi lapisan terluar kulit tikus dengan gunting lurus dan pisau bedah. Dilakukan insisi lapisan peritoneal dari daerah abdominal hingga toraks. Dibuat lubang pada vena cava untuk drainase darah. Dilakukan perfusi jantung dengan 12 ml HBSS dingin melalui spuit 20 ml hingga warna ginjal berubah dari coklat kemerahan menjadi coklat pudar. Dilakukan pengambilan ginjal kanan dan kiri dengan memotong arteri dan vena ginjal. Dipastikan bahwa lemak tidak ikut terambil. Spesimen ginjal dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 5 ml media transfer (pH 7) dingin dan dilakukan penimbangan berat ginjal.

Evaluasi nefropati diabetik dilakukan pada akhir minggu ke-8 penelitian dengan cara tikus ditempatkan pada *individual metabolic cages* dan urin dikumpulkan dalam 24 jam. Kadar albumin urin tikus diukur dengan menggunakan metode ELISA. Urin ditempatkan dalam *ependorf*. Metode pengukuran mengacu pada protokol yang ada pada Rat Albumin ELISA *kit* dan pembacaan menggunakan ELISA *reader*.

Pengukuran ekspresi subunit p65 NF- κ B dilakukan dengan prosedur sebagai berikut. Pertama, jaringan ginjal difiksasi dalam buffer formalin 10%, di-*embedded* dalam parafin. Selanjutnya, sayatan parafin dioven pada suhu 10°C semalaman. Kemudian sediaan difiksasi dengan xylol 1 dan 2 masing-masing selama 10 menit, dilanjutkan dengan etanol absolut 1 dan 2 masing-masing selama 5 menit, dilanjutkan etanol 90% selama 5 menit, dan etanol 70% selama 5 menit. Kemudian direndam PBST 1, 2, dan

3 masing-masing selama 5 menit. Dilanjutkan direndam buffer sitrat 10 mM pH 6 selama 15 menit pada suhu 120°C. Kemudian preparat dan wadah dikeluarkan dari oven dan ditunggu kurang lebih 10 menit. Dilanjutkan direndam dalam PBST selama 5 menit sebanyak 3 kali. Dilakukan *blocking* BSA 2% dalam PBST pada suhu ruang selama 1 jam. Cuci PBST selama 8 menit sebanyak 3 kali. Kemudian direndam dalam antibodi sekunder dalam BSA 2% selama 1 jam. Kemudian dicuci dalam PBST selama 8 menit sebanyak 3 kali. Selanjutnya ditetaskan gliserol 10% sebanyak 5 mikroliter dan ditutup oleh cover glass. Diamati menggunakan mikroskop pemindai berteknologi laser konfokal. Prosedur dilakukan dalam kondisi gelap menggunakan mikroskop pemindai berteknologi laser konfokal I X 81 dengan objektif 400 kali. Protein p65 dapat terdeteksi menggunakan filter yang didesain untuk mendeteksi FITC (eksitasi/emisi = 490/525 nm). Foto diproses menggunakan perangkat lunak Olympus Fluoview ver 1.7a. *viewer* dan selanjutnya diolah menggunakan perangkat lunak Image J ver 1.50.¹¹

Seluruh teknis pengolahan data hasil penelitian dianalisis secara komputerisasi dengan menggunakan *software Statistical Product and Service Solution*, IBM SPSS Statistics 20 dengan tingkat signifikansi atau nilai probabilitas 0,05 ($p=0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$). Langkah-langkah uji hipotesis komparatif adalah sebagai berikut: uji normalitas data, uji homogenitas varian, uji *one-way ANOVA*, dan *post hoc test (uji least significant difference)*.

HASIL

Pada awal penelitian, tidak didapatkan perbedaan rerata berat tikus yang signifikan pada semua kelompok perlakuan dengan $p=0,278$. Pada akhir penelitian didapatkan peningkatan berat tikus meningkat pada semua kelompok perlakuan (Tabel 1). Tabel 2 menunjukkan kadar gula darah pada awal penelitian sebelum dilakukan induksi diabetes dengan injeksi STZ. Kadar gula darah bersifat homogen, dengan kadar gula darah terendah pada kelompok kombinasi asam rosmarinat dan telmisartan sebesar 92,50 (simpang baku [SB] 17,92) mg/dL, sedangkan kadar gula darah tertinggi pada kelompok kontrol positif sebesar 105,00 (SB 9,09) mg/dL.

Pengukuran gula darah pada kontrol negatif dilakukan pada awal penelitian karena kontrol negatif tidak diberikan injeksi STZ, sedangkan pada kontrol positif, kelompok perlakuan asam rosmarinat, kelompok perlakuan telmisartan, serta kelompok kombinasi asam rosmarinat dan telmisartan dilakukan pengukuran gula darah 10 hari setelah injeksi STZ. Tabel 2 menunjukkan

Tabel 1. Karakteristik dasar subjek

| Kelompok | n tikus | Berat tikus (gram), rerata (simpang baku [SB]) | |
|-------------------------------|---------|--|-----------------|
| | | Awal Penelitian | Akhir Perlakuan |
| Kontrol - | 3 | 190,67 (32,72) | 296,67 (30,44) |
| Kontrol + | 4 | 188,25 (11,32) | 378,00 (69,44) |
| Asam rosmarinat | 4 | 202,00 (23,73) | 314,50 (98,06) |
| Telmisartan | 4 | 171,75 (32,52) | 288,75 (33,04) |
| Asam rosmarinat + telmisartan | 4 | 208,75 (14,57) | 243,00 (12,83) |

Tabel 2. Gula darah sebelum dan setelah injeksi streptozotisin

| Kelompok | Kadar gula darah (mg/dL), rerata (simpang baku [SB]) | |
|-------------------------------|--|--------------------------------|
| | Sebelum injeksi streptozotisin | Setelah injeksi streptozotisin |
| Kontrol - | 95,67 (9,21) | - |
| Kontrol + | 105,00 (9,09) | 352,50 (61,57) |
| Asam rosmarinat | 96,00 (16,51) | 388,75 (37,18) |
| Telmisartan | 100,00 (7,12) | 319,25 (25,89) |
| Asam rosmarinat + telmisartan | 92,50 (17,92) | 394,00 (49,02) |

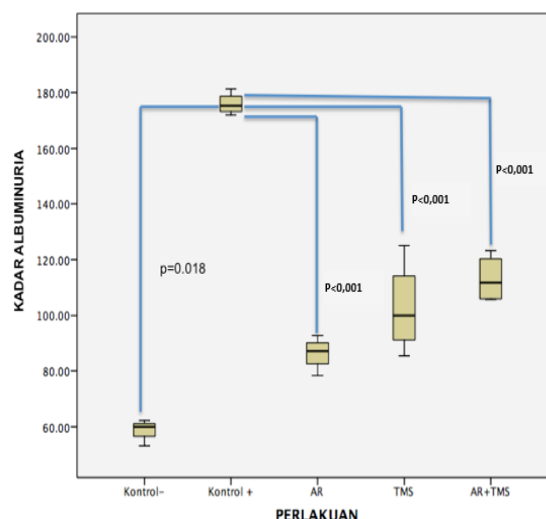
kadar gula darah terendah sesudah injeksi STZ pada kelompok perlakuan telmisartan dengan rerata kadar gula darah 319,25 (25,89) mg/dL. Rerata kadar gula darah tertinggi sesudah injeksi STZ yaitu 394,00 (49,02) mg/dL pada kelompok kombinasi asam rosmarinat dan telmisartan. Pada uji statistik *one-way* Anova didapatkan perbedaan rerata gula darah yang signifikan antara kontrol negatif dengan kontrol positif, kelompok perlakuan asam rosmarinat, kelompok perlakuan telmisartan serta kelompok kombinasi asam rosmarinat dan telmisartan dengan nilai $p < 0,001$.

Pada akhir penelitian (minggu ke-8) dilakukan evaluasi nefropati diabetik dengan mengukur kadar albuminuria. Pada penelitian ini albuminuria pada kontrol negatif sebesar 58,45 (SB 4,77) mg/mL sedangkan pada kontrol positif sebesar tiga kali lipat dari kontrol negatif yaitu sebesar 175,92 (SB 3,97) mg/mL. Pada uji *one way* Anova didapatkan perbedaan rerata albuminuria yang signifikan di antara kelima kelompok perlakuan dengan nilai $p < 0,001$. Pada analisis *post hoc test multiple comparisons* didapatkan perbedaan konsentrasi albuminuria yang signifikan antara kontrol positif dengan kontrol negatif ($p = 0,018$), kelompok perlakuan asam rosmarinat ($p < 0,001$), kelompok perlakuan telmisartan ($p < 0,001$), dan kombinasi asam rosmarinat dan telmisartan ($p < 0,001$) sesuai Gambar 1 berikut.

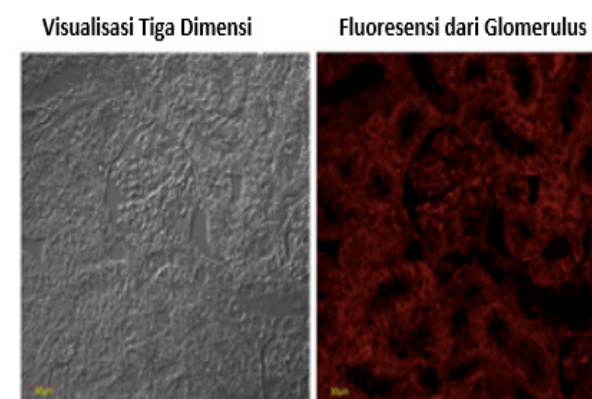
Pada perbandingan antarkelompok perlakuan, terdapat perbedaan konsentrasi albuminuria yang signifikan antara kelompok perlakuan asam rosmarinat dengan kelompok perlakuan kombinasi asam rosmarinat

dan telmisartan ($p = 0,014$). Namun, tidak didapatkan perbedaan konsentrasi albuminuria yang signifikan antara kelompok perlakuan asam rosmarinat dan kelompok perlakuan telmisartan ($p = 0,294$), maupun antara kelompok kombinasi asam rosmarinat dan telmisartan dengan kelompok perlakuan telmisartan ($p = 1,000$).

Tabel 3 menunjukkan ekspresi subunit p65 NF- κ B pada akhir penelitian. Ekspresi subunit p65 NF- κ B terendah pada kelompok perlakuan telmisartan sebesar 355,68 (SB 44,71) *arbitrary unit*, sedangkan ekspresi subunit p65 NF- κ B tertinggi pada kontrol positif sebesar 702,19 (SB 189,69) *arbitrary unit*. Hasil analisis menunjukkan terdapat perbedaan rerata ekspresi subunit p65 NF- κ B yang signifikan pada kelompok perlakuan telmisartan terhadap kontrol positif ($p < 0,001$), kelompok perlakuan asam rosmarinat ($p = 0,002$), serta kombinasi asam rosmarinat dan telmisartan ($p = 0,023$). Namun, tidak didapatkan perbedaan rerata ekspresi subunit p65 NF- κ B antara kontrol negatif dengan kelompok perlakuan telmisartan ($p = 0,177$) (Gambar 3).

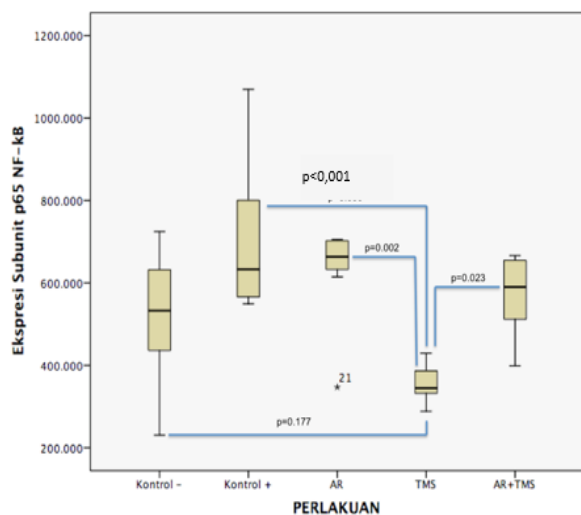


Gambar 1. Rerata kadar albuminuria pada akhir penelitian (minggu ke-8)

Gambar 2. Hasil pewarnaan immunofluoresensi ekspresi subunit p65 NF- κ B

Tabel 3. Ekspresi subunit p65 NF-kB pada akhir penelitian

| Kelompok | Ekspresi subunit p65 NF-kB (<i>arbitrary unit</i>), rerata (simpang baku [SB]) |
|----------------------------------|---|
| Kontrol - | 519,70 (158,12) |
| Kontrol + | 702,19 (189,69) |
| Asam rosmarinat | 631,19 (119,21) |
| Telmisartan | 355,68 (44,71) |
| Asam rosmarinat + telmisartan | 572,37 (98,09) |



Gambar 3. Rerata ekspresi subunit p65 NF-kB pada kelompok perlakuan

DISKUSI

Nuclear factor-kB normalnya terletak di sitoplasma dalam bentuk yang tidak aktif yang terikat pada protein inhibitor IκB. Ketika diaktivasi, IκB secara cepat akan terdegradasi dan NF-kB akan translokasi ke nukleus dan aktivasinya berlanjut, menyebabkan regulasi transkripsi dari gen target yang mengkode sitokin pro-inflamasi. NF-kB terdiri dari dua subunit, yaitu p50 dan p65, dengan p65 memiliki domain transkripsi.^{12,13}

Berdasarkan studi literatur, asam rosmarinat memiliki empat hidrogen fenolik yang mampu mengontrol oksidasi radikal bebas, dan mengandung dua cincin katekol (1,2 - *dihydroxybenzene*) yang dapat memberikan kualitas polaritas. Asam rosmarinat (AR) dapat membentuk ikatan hidrogen antarmolekul antara hidrogen bebas dari hidroksilnya dan dari radikal *phenoxyl*-nya, yang meningkatkan stabilitas radikalnya. Pada penelitian *in vitro* dan *in vivo* telah dibuktikan aktivitas antioksidan yang luar biasa dari AR pada kerusakan *peroxidative* terhadap biomembran. Dibandingkan dengan asam *caffeic* dan turunan lainnya, AR adalah salah satu senyawa yang menghambat secara kuat radikal 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) yang sangat reaktif.¹⁴

Gao, dkk.¹⁵ mempelajari efek anti-apoptosis dan anti-oksidan AR pada sel astrosit yang diinduksi apoptosis oleh H₂O₂, dan ditemukan bahwa AR menurunkan kadar ROS, malondialdehid (MDA), dan kerusakan sel yang diinduksi H₂O₂. Hasil studi tersebut menunjukkan efektivitas AR sebagai anti-oksidan dan anti-apoptosis. Pada konteks ini, AR dapat menurunkan pembentukan ROS dan apoptosis.¹ Fadel, dkk.¹⁶ meneliti efikasi AR sebagai antioksidan alami yang menurunkan dan mencegah gangguan (peroksidasi lipid) dari membran lipid oleh stres oksidatif. Terdapat korelasi negatif antara AR dan konsentrasi peroksidasi lipid, termasuk MDA ($P < 0,05$).¹⁷

Asam rosmarinat (AR) telah diketahui memiliki kerja anti-oksidan dan antiinflamasi dengan penghambatan aktivitas lipooksigenase.¹⁸ Pada hewan, Bacanlı, dkk.¹⁹ menilai kemampuan AR untuk memperbaiki stres oksidatif yang diinduksi sepsis dengan meningkatkan aktivitas anti-oksidan dan kapasitas perbaikan DNA. Pada serum, kapasitas total anti-oksidan bertambah ($p < 0,05$) pada kelompok yang mendapatkan AR, sedangkan kadar MDA menurun dengan pemberian AR.²⁰ Aktivitas antioksidan ini disebabkan oleh gugus fenolik hidroksil (-OH).²¹ Suplementasi AR pada tikus yang tua meningkatkan aktivitas anti oksidan enzim superoksida dismutase, katalase dan glutathion peroksidase, dan menurunkan produksi malonaldehida di hati dan ginjal yang mana respon ini tergantung dari dosis AR.²²

Pada penelitian Petersen dan Simmonds⁵ serta Tavafi⁶ membuktikan bahwa AR mampu menurunkan NF-kB, meningkatkan *glutathione transferase*, anti-aktivitas Bcl-2, pemakan peroksinitrit, memperbaiki aktivitas SOD, GPX dan CAT pada ginjal. Namun, pada penelitian ini ekspresi subunit p65 NF-kB pada pemberian asam rosmarinat sebesar 631,19 (SB 119,21) *arbitrary unit* dibandingkan kontrol positif (tikus diabetes tanpa perlakuan) sebesar 702,19 (SB 189,69) *arbitrary unit* dengan nilai $p=1,000$ (Gambar 3). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian asam rosmarinat dengan dosis 75 mg/hari tidak mampu menurunkan ekspresi subunit p65 NF-kB. Pada beberapa penelitian lain, dosis asam rosmarinat yang digunakan berbeda-beda dan hal ini tergantung pada metode pemberian. Pada pemberian injeksi sama dengan secara oral, dosis berkisar 0,1 sampai 10 mg/kg maksimal 50mg/kg pada binatang coba. Semua penelitian dengan dosis tersebut, menunjukkan hasil yang memuaskan. Hal ini menunjukkan bahwa efek *dose-dependent* sangat kecil serta puncak dari efek fisiologis AR juga telah tercapai dengan dosis rendah sehingga pemakain AR dosis kecil pun masih menunjukkan hasil yang memuaskan. Namun, Zhang, dkk.²² menyatakan bahwa respons antioksidan pada

pemberian suplementasi asam rosmarinat tergantung pada dosis yang digunakan.

Meskipun pada penelitian ini belum mampu menunjukkan efek penurunan ekspresi subunit p65 NF- κ B yang memuaskan, belum tentu asam rosmarinat tidak memberikan harapan pada tata laksana nefropati diabetik. Hal ini dikarenakan penyebab ND bersifat multifaktorial. Berdasarkan kerangka teori dan konsep yang telah disusun, stres oksidatif merupakan salah satu jalur patogenesis ND yang mana NF- κ B merupakan variabel perantara terhadap kerusakan glomerulus.

Pada penelitian ini juga didapatkan ekspresi subunit p65 NF- κ B pada kelompok perlakuan telmisartan sebesar 355,68 (SB 44,71) *arbitrary unit*. Pada analisis *post hoc* didapatkan perbedaan rerata ekspresi subunit p65 NF- κ B yang bermakna pada kelompok perlakuan telmisartan dibandingkan kontrol positif ($p < 0,001$), kelompok perlakuan asam rosmarinat ($p = 0,002$), dan kombinasi asam rosmarinat dan telmisartan ($p = 0,023$). Serta, tidak didapatkan perbedaan rerata ekspresi subunit p65 NF- κ B yang bermakna pada kelompok perlakuan telmisartan dan kontrol negatif (Gambar 3).

Data terbaru juga menunjukkan bahwa telmisartan memiliki sifat sebagai anti-inflamasi dan anti-oksidan.^{23,24} Hasil penelitian menunjukkan hambatan terhadap TNF alfa diinduksi oleh aktivasi NF- κ B oleh telmisartan di sel endotel. Efek anti-inflamasi telmisartan ini tidak dimediasi oleh aktivasi PPAR gamma sehingga aktivasi PPAR gamma kemungkinan tidak memiliki peranan yang besar pada efek anti-inflamasi telmisartan pada sel endotel.²⁵ Telmisartan telah terbukti meningkatkan kadar adiponektin pada manusia, yang mungkin disebabkan efek dari PPAR gamma, yang memiliki ekspresi yang tinggi pada sel adiposit untuk menghasilkan adiponektin.²⁶ Pada sisi lain, ekspresi PPAR gamma terbatas pada sel endotel sehingga menjelaskan ada jalur alternatif untuk mekanisme anti-inflamasi telmisartan pada sel endotel. Angiotensin II dapat menginduksi aktivasi NF- κ B, meskipun kurang poten dibandingkan dengan TNF alfa. Sehingga, memungkinkan bagi telmisartan memberikan sinyal inhibisi pada jalur aktivasi NF- κ B melalui reseptor AT1. Namun, hal ini masih memerlukan penjelasan lebih lanjut.

Hambatan terhadap aktivasi NF- κ B yang diinduksi TNF alfa oleh telmisartan secara langsung berhubungan dengan masa inkubasi yang lebih lama pada studi ini.²⁵ Semakin lama masa preinkubasi dengan telmisartan menyebabkan supresi lebih besar pada aktivasi NF- κ B yang diinduksi TNF alfa. Hal ini menunjukkan bahwa kemungkinan telmisartan menginduksi produksi protein anti-inflamasi yang menghambat aktivasi NF- κ B. Tetapi,

telmisartan masih menunjukkan efek inhibisi yang signifikan ketika ditambahkan 30 menit setelah paparan TNF alfa, yang menunjukkan adanya mekanisme lain yang berperan. Hasil penelitian terakhir menunjukkan interaksi antara NF- κ B dan sinyal TNF alfa menginduksi aktivasi IKK β yang meningkatkan jumlah stres oksidatif, menyebabkan disfungsi endotel pada DM tipe 2. Sehingga, telmisartan mungkin menghambat IKK β , tapi hal ini masih perlu penjelasan lanjutan.²⁷

Eksperimen dengan fluoroskopi laser menunjukkan inhibisi dengan antagonis reseptor AT1 telmisartan akan menurunkan pembentukan ROS yang diinduksi Ang-II pada GEC. Stimulasi Ang II meningkatkan translokasi subunit p65 NF- κ B dari sitoplasma ke nukleus dan menyebabkan aktivasi NF- κ B pada GEC tikus. Sehingga, blokade terhadap reseptor AT1 oleh telmisartan akan mengurangi aktivasi NF- κ B yang diinduksi Ang II.²⁸ Hal ini sejalan dengan penelitian ini dimana telmisartan menurunkan ekspresi subunit p65 NF- κ B pada level yang setara dengan kontrol negatif.

Gambar 3 menunjukkan ekspresi subunit p65 NF- κ B pada kombinasi asam rosmarinat dan telmisartan sebesar 572,37 (SB 98,09) *arbitrary unit*. Pada analisis *post-hoc* didapatkan perbedaan rerata ekspresi subunit p65 NF- κ B yang bermakna pada kombinasi asam rosmarinat dan telmisartan dengan kelompok perlakuan telmisartan ($p = 0,023$). Namun, jika dilihat secara kualitatif maka rerata ekspresi subunit p65 NF- κ B pada kelompok perlakuan asam rosmarinat lebih besar dibandingkan kelompok telmisartan. Hal ini menunjukkan bahwa pada pemberian kombinasi asam rosmarinat dan telmisartan tidak mampu menurunkan ekspresi NF- κ B pada level di bawah dari pemberian tunggal telmisartan. Sehingga, pemberian tunggal telmisartan sudah mampu menurunkan ekspresi NF- κ B pada level setara dengan kontrol negatif, yaitu tikus yang tidak diberikan perlakuan apapun.

Pada hipotesis penelitian menyebutkan bahwa penambahan asam rosmarinat lebih baik dalam menurunkan ekspresi subunit p65 NF- κ B dibandingkan pemberian tunggal telmisartan. Namun, hasil akhir penelitian menunjukkan bahwa pemberian tunggal telmisartan lebih baik dalam menurunkan ekspresi subunit p65 NF- κ B dibandingkan penambahan asam rosmarinat dan telmisartan. Hal ini dimungkinkan akibat terjadinya interaksi antara zat-zat aktif yang terkandung di dalam asam rosmarinat yang dapat bersifat menginduksi atau menghambat aktivitas zat aktif telmisartan, begitupula sebaliknya. Meskipun penelitian *in-silico* menyebutkan bahwa asam rosmarinat memiliki skor *probability activity* sebagai anti-inflamasi, anti-oksidan, anti-diabetik,

scavenger radikal bebas, stimulan fungsi ginjal dan terapi ND dibandingkan telmisartan yang hanya memiliki skor *probability activity* untuk stimulan fungsi ginjal dan terapi ND. Namun, pada penambahan asam rosmarinat ternyata tidak mampu memberikan penambahan efek anti-inflamasi dan anti-oksidan untuk telmisartan.

Keterbatasan penelitian ini adalah penggunaan dosis asam rosmarinat yang hanya pada satu dosis yakni 75 mg/kg/hari berdasarkan penelitian sebelumnya. Pada penelitian ini yang dinilai adalah ekspresi subunit p65 NF- κ B yang merupakan variabel perantara dalam proses nefropati diabetik. Sehingga, dibutuhkan penelitian lebih lanjut tentang efek asam rosmarinat terhadap ekspresi subunit p65 NF- κ B dengan dosis yang lebih tinggi yaitu 100 mg/kg/hari dan 200 mg/kg/hari serta penelitian lebih lanjut tentang efek asam rosmarinat terhadap penurunan derajat kerusakan glomerulus yang dilihat secara histopatologis.

SIMPULAN

Didapatkan penurunan ekspresi subunit p65 NF- κ B pada kelompok telmisartan, namun penambahan asam rosmarinat pada tikus diabetes yang diberikan telmisartan tidak dapat menurunkan ekspresi subunit p65 NF- κ B pada level setara dengan kontrol negatif.

DAFTAR PUSTAKA

- Lee HJ, Cho HS, Park E, Kim S, Lee SY, Kim CS, et al. Rosmarinic acid protects human dopaminergic neuronal cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Toxicology*. 2008;250:109–15.
- Satirapoj B. Review on pathophysiology and treatment of diabetic kidney disease. *J Med Assoc Thai*. 2010;93 (Suppl. 6):S228–41.
- Forbes JM, Coughan MT, Cooper ME. Oxidative stress a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes*. 2008;57:1446–54.
- Tavafi M. Diabetic nephropathy and antioxidants. *J Nephropathology*. 2013;2:20–7.
- Petersen M, Simmonds MSJ. Rosmarinic acid. *Phytochemistry*. 2003;62:121–5.
- Tavafi M. Complexity of diabetic nephropathy pathogenesis and design of investigations. *J Renal Inj Prev*. 2013;2:59–62.
- Wennmann DO, Hsu HH, Pavenstadt H. The renin-angiotensin-aldosterone system in podocytes. *Semin Nephrol*. 2012;32(4):377–84.
- Wienen W, Entzeroth M, van Meel JCA, Stangier J, Busch U, Ebner T, et al. A review on telmisartan: a novel, long-acting angiotensin II-receptor antagonist. *Cardiovascular Drug Rev*. 2000;18(2):127–54.
- Mallat SG. What is a preferred angiotensin II receptor blocker-based combination therapy for blood pressure control in hypertensive patients with diabetic and non-diabetic renal impairment? *Cardiovasc Diabetol*. 2012;11:32.
- Furman BL. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Curr Protoc Pharmacol*. 2015;70:5.
- Mallipattu SK, Liu R, Zheng F, Naria G, Ma'ayan A, Dikman S, et al. Kruppel-like factor 15 (KLF15) is a key regulator of podocyte differentiation. *J Biol Chem*. 2012;287(23):19122–35.
- Barnes PJ, Karin M. Nuclear Factor- κ B — a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med*. 1997;336:1066–107.
- Lee HB, Yu MR, Yang YI, Ha H. Reactive oxygen species-regulated signaling pathways in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(8 Suppl 3):S241–5.
- Bhatt R, Mishra N, Bansal PK. Phytochemical, pharmacological and pharmacokinetics effects of rosmarinic acid. *J Pharm Sci Innov*. 2013;2(2):28–34.
- Gao LP, Wei HL, Zhao HS, Xiao SY, Zheng RL. Antiapoptotic and antioxidant effects of rosmarinic acid in astrocytes. *Pharmazie*. 2005;60:62–5.
- Fadel O, El Kirat K, Morandat S. The natural antioxidant rosmarinic acid spontaneously penetrates membranes to inhibit lipid peroxidation in situ. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011;1808:2973–80.
- Luño V, Gil L, Olaciregui M, González N, Jerez RA, de Blas I. Rosmarinic acid improves function and in vitro fertilising ability of boar sperm after cryopreservation. *Cryobiology*. 2014;69:157–62.
- Stansbury J. Rosmarinic acid as a novel agent in the treatment of allergies and asthma. *J Restor Med*. 2014;3:121–6.
- Bacanli M, Aydın S, Taner G, Göktaş HG, Şahin T, Başaran AA, et al. Does rosmarinic acid treatment have protective role against sepsis-induced oxidative damage in Wistar Albino rats? *Hum Exp Toxicol*. 2016;35:877–86.
- Hajhosseini L, Khaki A, Merat E, Ainehchi N. Effect of rosmarinic acid on sertoli cells apoptosis and serum antioxidant levels in rats after exposure to electromagnetic fields. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2013;10(6):477–80.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*. 1996;20(7):933–56.
- Zhang Y, Chen X, Yang L, Zu Y, Lu Q. Effects of rosmarinic acid on liver and kidney antioxidant enzymes, lipid peroxidation and tissue ultrastructure in aging mice. *Food Function*. 2015;6:927–31.
- Nagai N, Oike Y, Noda K, Urano T, Kubota Y, Ozawa Y, et al. Suppression of ocular inflammation in endotoxin-induced uveitis by blocking the angiotensin II type 1 receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46:2925–31.
- Cianchetti S, Del Fiorentino A, Colognato R. Anti-inflammatory and anti-oxidant properties of telmisartan in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2008;198:22–8.
- Nakano A, Hattori Y, Aoki C, Jojima T, Kasai K. Telmisartan inhibits cytokine-induced nuclear factor- κ B activation independently of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Hypertens Res*. 2009;32(9):765–9.
- Delles C, Raff U, Mimran A, Fauvel JP, Ruilope LM, Schneider RE. Effects of telmisartan and ramipril on adiponectin and blood pressure in patients with type 2 diabetes. *Am J Hypertens*. 2008;21(12):1330–6.
- Yang J, Park Y, Zhang H, Xu X, Laine GA, Dellsperger KC, et al. Forward signaling of TNF α and NF- κ B via IKK β pathway contributes to insulin resistance and coronary arterial dysfunction in type 2 diabetic mice. *Am J Physiol*. 2009;296:H1850–8.
- Pan Q, Yang XH, Cheng YX. Angiotensin II stimulates MCP-1 production in rat glomerular endothelial cells via NAD(P)H oxidase-dependent nuclear factor- κ B signaling. *Braz J Med Biol Res*. 2009;42(6):531–6.