

PERAN KUERSETIN TERHADAP EKSPRESI NRF2 PADA STRES OKSIDATIF AKIBAT PENYAKIT GINJAL KRONIK

¹Ika Satya Perdhana, ²Dona Suzana

¹Fakultas Kedokteran Universitas Gunadarma, ²Fakultas Farmasi Universitas Gunadarma
Jl. Margonda Raya No. 100, Depok 16424, Jawa Barat
ikasatya.is@gmail.com, dona.suzana12@gmail.com

Abstrak

Penyakit Ginjal Kronik (PGK) merupakan masalah kesehatan di seluruh penjuru dunia. PGK menjadi penyebab menurunnya kualitas hidup penderitanya sekaligus meningkatkan risiko kematian. Penyakit Ginjal Kronik ditandai dengan terjadinya kerusakan ginjal dalam waktu lama dan progresif. Gangguan pada PGK berkaitan dengan kejadian stres oksidatif, yaitu keadaan di mana Reactive Oxygen Species (ROS) terbentuk melebihi pertahanan antioksidan. Kuersetin sebagai bagian keluarga flavonoid diketahui memiliki aktivitas antioksidan. Penelitian sebelumnya mendapatkan bahwa pemberian kuersetin mampu meningkatkan ekspresi protein Nuclear factor related erythroid factor 2 (Nrf2) di dalam nukleus pada tikus yang mengalami PGK. Penelitian ini merupakan penelitian lanjutan untuk mengkonfirmasi apakah peningkatan ekspresi protein Nrf2 di dalam nukleus terjadi pada tahap transkripsi. **Metode:** Jaringan ginjal tikus Sprague-Dawley dari penelitian terdahulu yang tersimpan pada suhu -80°C , diukur ekspresi mRNA Nrf2, menggunakan qRT PCR. Terdapat 4 kelompok penelitian yaitu kelompok kontrol normal, kelompok dengan nefrektomi 5/6 berturut-turut diberi CMC 0,5%, kaptopril 10 mg/kgBB, dan kuersetin 100 mg/kgBB. Ekspresi mRNA Nrf2 dianalisis statistik menggunakan uji ANOVA yang dilanjutkan dengan multiple comparison post hoc dengan LSD, Kruskal-Wallis untuk data yang tidak memenuhi syarat uji ANOVA dimana perbedaan dianggap bermakna secara statistik bila $p < 0.05$. Tidak ada perbedaan bermakna terhadap ekspresi Nrf2 pada pemberian kuersetin 100 mg/kgBB meskipun terlihat ada kecenderungan bahwa ekspresi gen-gen tersebut meningkat pada kelompok yang mendapatkan kuersetin. Pemberian kuersetin 100mg/kgBB tidak meningkatkan ekspresi mRNA Nrf2 pada tikus pascanefrektomi 5/6.

Kata kunci: antioksidan, kuersetin, Nrf2, PGK, stres oksidatif,

Abstract

Chronic Kidney Disease (CKD) is a health problem in all corners of the world. CKD is a cause of decreased quality of life of sufferers while increasing the risk of death. Chronic Kidney Disease is characterized by the occurrence of kidney damage in a long time and progressive. Disturbances in CKD are related to the incidence of oxidative stress, which is a condition in which Reactive Oxygen Species (ROS) are formed beyond antioxidant defenses. Quercetin as part of the flavonoid family is known to have antioxidant activity. Previous research found that administration of quercetin could increase the expression of Nuclear factor related erythroid factor 2 (Nrf2) protein in the nucleus in rats with CKD. This study is a follow-up study to confirm whether the increased expression of Nrf2 protein in the nucleus occurs at the transcription stage. **Methods:** Sprague-Dawley rat kidney tissue from previous studies stored at -80°C , measured by Nrf2 mRNA expression, using qRT PCR. There are 4 research groups namely normal control group, the group with 5/6 nephrectomy were consecutively given CMC 0.5%, captopril 10 mg / kgBB, and quercetin 100 mg / kgBB. Nrf2 mRNA expression was statistically analyzed using ANOVA test followed by post hoc multiple comparison with LSD,

Kruskal-Wallis for data that did not meet the ANOVA test requirements where the difference was considered statistically significant when $p < 0.05$. There was no significant difference in the expression of Nrf2 in administering quercetin 100 mg / kgBB although there was a tendency that the expression of these genes increased in the quercetin group. Quercetin giving 100mg / kgBB did not increase the expression of Nrf2 mRNA in post-corrective mice 5/6 .

Keywords: antioxidants, quercetin, Nrf2, CKD, oxidative stress

PENDAHULUAN

Penyakit ginjal kronik (PGK) merupakan suatu masalah kesehatan di seluruh penjuru dunia (Levey, 2005). Mengingat fungsi ginjal yang sangat vital, PGK menjadi penyebab menurunnya kualitas hidup penderitanya dan sekaligus meningkatkan risiko kematian. Penyakit ginjal kronik sangat berisiko untuk berkembang menjadi gagal ginjal total permanen. (Small, 2012, Rieko, 2013). Penyebab terbanyak PGK adalah hipertensi dan diabetes mellitus, namun berbagai penyakit seperti infeksi kronik, obstruksi, batu saluran kemih, trauma dan keganasan juga berperan dalam terjadinya PGK. (McMillan, 2013). Menurut data riset kesehatan dasar (Riskesdas) tahun 2013 (Kementerian Kesehatan RI, 2013), di Indonesia didapatkan prevalensi penyakit ginjal kronik sebesar 0,2% dan terus meningkat seiring bertambahnya usia, sedangkan dari data penyakit ginjal di Amerika angka morbiditas penyakit ginjal mencapai 3,9 juta penduduk dewasa atau sebesar 1,7%. Mortalitas seluruh penyakit ginjal mencapai 47.112 orang atau 14,9 per 100.000 penduduk dalam populasi pada tahun 2013 (Kementerian Kesehatan RI, 2013).

Penyakit ginjal kronik didefinisikan sebagai kerusakan ginjal yang terjadi selama minimal tiga bulan dengan kriteria yaitu abnormalitas struktur atau fungsi ginjal dan penurunan Laju Filtrasi Glomerulus (LFG) (Levey, 2005, Cortinovic 2016). Progresivitas PGK diduga terjadi karena terjadi fibrosis yang terbentuk setelah cedera awal. Berbagai mekanisme dapat berperan dalam progresivitas PGK ini seperti kerusakan ginjal progresif termasuk

hipertensi glomerular maupun sistemik, serta berbagai sitokin dan faktor pertumbuhan terutama gangguan sistem renin-angiotensin aldosteron (Levey, 2005).

Mekanisme lain yang berpengaruh dalam hal ini adalah dislipidemia dan proteinuria. (Cortinovic, 2016). Gangguan fungsi ginjal berkaitan erat dengan stres oksidatif, yaitu ketidakseimbangan antara pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) dengan pertahanan antioksidan. Ketidakseimbangan ini dapat menyebabkan oksidasi biomolekul sehingga terjadi perubahan struktur dan fungsi molekul tersebut (Schnaper, 2014). Pembentukan ROS terutama terjadi di mitokondria dan sebagian di sel fagosit. ROS terdiri atas beragam komposisi antara lain adalah anion superoksida, hidrogen peroksida dan radikal hidrogen. ROS dalam jumlah kecil berfungsi fisiologis misalnya sebagai mekanisme pertahanan terhadap patogen. Namun, kelebihan ROS justru akan menyebabkan kerusakan sel melalui interaksi biomolekul sehingga terjadi efek negatif pada fungsi dan struktur seperti pada PGK (Matovinovic, 2009).

Pada sel yang mengalami stres oksidatif akan muncul respon berupa mekanisme pertahanan yang dimediasi terutama oleh faktor transkripsi Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*). Pada keadaan basal, Nrf2 dihambat oleh regulator negatif Keap1 (*Kelch ECH associating protein 1*) sehingga Nrf2 akan terdegradasi dalam waktu kurang dari 20 menit. Ketika sel mengalami stres oksidatif, terjadi perubahan ikatan antara Nrf2 dan Keap1 sehingga Nrf2 terlepas dan terakumulasi di dalam sitoplasma. Nrf2 yang terakumulasi di dalam sitoplasma akan

mudah mengalami translokasi ke dalam nukleus untuk menjalankan perannya sebagai faktor transkripsi pada ekspresi gen yang bergantung ARE (*antioxidan responsive element*).

Pada PGK yang berkaitan erat dengan stres oksidatif, pemberian antioksidan maupun penghambat sistem renin angiotensin aldosteron (RAAS) bermanfaat untuk menghambat kerusakan yang terus terjadi. Hal ini sejalan dengan *Group's Captopril Study* yang telah menyebutkan dengan jelas bahwa pemberian kaptopril dapat berperan dalam intervensi melalui hambatan sistem renin angiotensin aldosteron (RAAS) yang efektif untuk mencegah progresivitas PGK. (Fogo, 2007, Ong 1994). Kaptopril juga diketahui memiliki efek antioksidan sehingga pada PGK yang terjadi berkaitan sangat erat dengan stres oksidatif, pemberian kaptopril bermanfaat dalam hambatan RAAS maupun stres oksidatif dan diharapkan dapat berpengaruh untuk menghambat progresivitas PGK (Khattab, 2005, Yang 2010).

Bahan alam yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak kulit manggis, dimana mengandung kuersetin yang merupakan golongan flavonoid yang memiliki banyak aktivitas biologi seperti antialergi, antivirus, antiinflamasi, vasodilator dan antioksidan (Morales, 2006). Dari seluruh flavonoid di alam, kuersetin adalah yang paling banyak ditemukan. Kuersetin ini banyak terdapat pada berbagai buah dan sayur seperti bawang merah, brokoli dan apel (Pietta PG. 2000, Pradeep, 2016).

Penelitian yang dilakukan Layal menunjukkan bahwa pemberian kuersetin dosis 100 mg/kgBB cenderung meningkatkan ekspresi protein Nrf2 pada nukleus jaringan ginjal kelompok hewan uji yang mengalami nefrektomi 5/6 dibandingkan dengan kelompok hewan uji tanpa pemberian kuersetin melalui pemeriksaan imunohistokimia. Layal. 2015). Protein Nrf2 berperan dalam regulasi ekspresi gen

yang berperan sitoprotektif seperti HO1 dan dalam keadaan basal diregulasi oleh protein Keap1 (Culpepper, 1992). Aktivasi Nrf2 terjadi ketika terdapat paparan stres oksidatif, (Culpepper, 1992), namun pada penelitian Layal terjadi kecenderungan peningkatan ekspresi Nrf2 di dalam nukleus walaupun tidak terjadi stres oksidatif. Penelitian yang dilakukan oleh penulis merupakan penelitian lanjutan yang dilakukan oleh Layal (Layal, 2015) untuk membuktikan apakah peningkatan ekspresi protein Nrf2 di dalam nukleus akibat pemberian kuersetin terjadi pada tahap awal sintesis protein Nrf2, yaitu tahap transkripsi DNA. Faktor transkripsi Nrf2 merupakan anggota subfamily *Cap'n'Collar* (CNC) dari faktor transkripsi *basic leucine zipper*(bZIP) (Canning 2015).

Pada manusia, Nrf2 tersusun atas 605 asam amino dan tujuh regio yang dikenal dengan domain *Nrf2-ECH homology* (Neh). Neh1 ini berperan dalam meregulasi stabilitas Nrf2. Neh2 terdiri dari tujuh residu lisin yang bertanggung jawab terhadap konjugasi ubiquitin seperti dua *binding site* yang berikatan dengan Keap1 yaitu DLG dan ETGE, yang membantu meregulasi stabilitas Nrf2. Neh3-5 diduga berfungsi dalam transaktivasi dengan membentuk ikatan dengan komponen transkripsi. Neh6 seperti Neh1 dan Neh2, berperan dalam meregulasi stabilitas Nrf2. Neh7 berperan dalam represi Nrf2 (Canning, 2015).

Nrf2 merupakan faktor transkripsi yang berperan penting dalam mempertahankan homeostasis redoks sel dengan meregulasi ekspresi protein sitoprotektif. Aktivitas Nrf2 banyak dipengaruhi oleh interaksinya dengan *Kelch like ECH-associated protein 1* (Keap1) (Taguchi, 2011). Namun demikian, terdapat banyak faktor lain yang mempengaruhi aktivitas Nrf2, yang sering disebut sebagai mekanisme alternatif regulasi Nrf2. Termasuk di dalam mekanisme alternatif ini adalah fosforilasi Nrf2 oleh berbagai

protein kinase (PKC, PI3K/Akt, GSK-3 β , JNK) dan faktor epigenetik (mikroRNA-144, mikroRNA-28, mikroRNA-200, dan metilasi promotor) (Kaspar, 2009).

Kuersetin

Kuersetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyl flavone) adalah anggota flavonoid, salah satu dari golongan polifenol terbanyak pada tanaman. (Serrano, 2009). Kandungan kuersetin pada makanan bahan alam secara umum sekitar 15-30 mg/kg berat segar, namun kandungan tertinggi pada bawang merah yaitu mencapai 1,2 g/kg berat segar. Manach, 2004). Asupan kuersetin harian tergantung dari jenis makanan yang dikonsumsi. Pada populasi Barat, asupan harian kuersetin berkisar 0-30 mg sedangkan pada negara lain berkisar 200-1200 mg. Kuersetin juga dapat dikonsumsi dari makanan harian sebanyak 10-125 mg/sajian (0,008-0,5%) per hari (Egert, 2008).

Seperti halnya flavonoid lain, kuersetin memiliki banyak aktivitas biologi maupun farmakologi. Manfaat flavonoid yang telah diketahui adalah sebagai antioksidan, antiinflamasi, antivirus, dan antibakteri. Menurut Rice-Evans kuersetin sebagai salah satu flavonoid, memiliki potensi antioksidan yang empat kali lebih tinggi dibandingkan dengan analog vitamin E Trolox. (Rice-Evans, 1995). Adanya aktivitas sebagai antioksidan ini menjadikan kuersetin berperan sebagai antikanker. Selain dapat beraktivitas sebagai antioksidan, kuersetin dapat berperan sebaliknya yaitu sebagai prooksidan tergantung dari kadar dan durasi pemberiannya (Lee, 2015).

Kuersetin ini banyak ditemukan pada sayur dan buah dalam bentuk glikosida terutama pada bawang, apel, teh, dan brokoli. Kuersetin mudah diabsorpsi dan terdistribusi luas di berbagai jaringan namun kelarutannya dalam air sangat rendah, waktu paruhnya singkat, dan bioavailabilitasnya rendah jika diberikan secara oral. (Alrawaiq, 2014). Berbagai studi

menemukan bahwa kuersetin bermanfaat sebagai *scavenger* radikal yang dapat mencegah atau memperlambat kondisi yang terjadi akibat stres oksidatif. Kuersetin diketahui berinteraksi dengan sistem pertahanan sel seperti NADPH: kuinon oksidoreduktase, iNOS, monooksigenase, COX, Xantin oksidase, lipooksigenase, hemooksigenase-1. Induksi antioksidan seperti GSH memperbaiki mekanisme perlindungan biologis secara bermakna terhadap pengaruh toksik ROS. (Serrano, 2009). Penelitian yang dilakukan Serrano 2009 pada sel HepG2 menunjukkan bahwa kuersetin memodulasi Nrf2 tergantung dari konsentrasi dan lamanya paparan kuersetin. Pemberian kuersetin dengan dosis 10 dan 25 μ M selama 4 jam mampu meningkatkan translokasi Nrf2 ke dalam nukleus secara bermakna, sementara dosis 50 μ M justru menurunkannya. Pada pemberian kuersetin selama 18 jam, peningkatan translokasi Nrf2 ke dalam nukleus terjadi pada pemberian kuersetin dosis 5-10 μ M. Dalam penelitian mengenai aktivitas antioksidan kuersetin, Serrano 2009 menemukan bahwa setelah pemberian 50 μ M selama 4 jam kuersetin mampu meningkatkan kadar GSH sementara pada pemberian selama 18 jam tidak menunjukkan adanya perubahan GSH. (Serrano 2009) Pemberian kuersetin dapat meningkatkan mRNA maupun protein Nrf2 namun tidak menyebabkan pemanjangan masa paruhnya (Kansanen, 2013).

METODE PENELITIAN

Penelitian ini berupa penelitian praklinis eksperimental pada jaringan tersimpan ginjal tikus dengan rancangan berpembanding, acak dan paralel. (Layal, 2015). Penelitian dilakukan di Departemen Farmakologi dan Terapeutik FKUI selama 7 bulan.

Jaringan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ginjal hewan uji dari penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Layal (Layal, 2015)., yaitu tikus jantan

Sprague-Dawley (dari Badan Pengawas Obat dan Makanan). Hewan uji memiliki berat badan 150-300 gram dan umur 10-16 minggu. Hewan uji ditempatkan pada ruangan dengan suhu dan kelembaban ruangan yang konstan, penerangan yang cukup, makanan pellet dan air minum *ad libitum*. Hewan uji dibagi menjadi empat kelompok yaitu kelompok kontrol normal, kelompok kontrol nefrektomi yang setelah mengalami nefrektomi diberi CMC 0,5%, kelompok yang setelah mengalami nefrektomi mendapatkan kaptopril, dan kelompok yang setelah mengalami nefrektomi mendapatkan kuersetin. Setelah terminasi hewan uji, jaringan ginjal disimpan dalam lemari pembeku bersuhu -80°C . (Layal, 2015).

Senyawa yang digunakan dalam uji ini adalah kuersetin yang diproduksi oleh PT. Sigma Aldrich dosis 100 mg/kgBB/hari. Dosis kuersetin yang digunakan dalam penelitian berdasarkan studi yang dilakukan Wang pada tikus dengan diabetik nefropati. (Wang, 2012). Perbandingan yang digunakan adalah Kaptopril (Indofarma) dengan dosis 10 mg/kgbb/hari sesuai dengan penelitian Khattab pada tikus dengan kerusakan ginjal dan jantung (Khattab, 2005).

Pengumpulan data berupa rasio ekspresi mRNA Nrf2 dilakukan menggunakan qRT-PCR Light Cycler Nano Roche[®] dengan kit *Faststart essential DNA green master* sesuai protokol. Nilai *quantification cycle* (Cq) akan dikalkulasi secara otomatis oleh software. Nilai Cq yang diperoleh kemudian diperhitungkan menggunakan metode Livak untuk mendapatkan tingkat ekspresi gen target setelah dibandingkan terhadap tingkat ekspresi gen referensi. (Livak, 2001)

Pemeriksaan PCR

Pemeriksaan PCR dilakukan melalui Isolasi RNA dari jaringan ginjal tersimpan, Sintesis c-DNA, dilanjutkan dengan PCR untuk menilai mRNA Nrf2. Hasil PCR

berupa nilai Cq (*quantification cycle*) yang akan dimasukkan ke dalam rumus untuk dihitung menggunakan metode Livak. Metode Livak yang digunakan untuk penghitungan ekspresi mRNA adalah sebagai berikut (Livak, 2001)

$$\begin{aligned} \Delta\text{Cq uji} &= \text{Cq target (uji)} - \text{Cq ref} \\ \Delta\text{Cq kontrol} &= \text{Cq target (kontrol)} - \text{Cq ref} \\ \Delta\Delta \text{Cq uji} &= \Delta\text{Cq uji} - \Delta\text{Cq kontrol} \\ \text{Rasio ekspresi mRNA} &= 2^{-\Delta\Delta\text{Cq uji}} \end{aligned}$$

Analisis statistik

Data yang diperoleh berupa data numerik dengan membandingkan hasil dari empat kelompok uji sehingga analisis statistik yang digunakan adalah uji parametrik ANOVA atau arah dengan syarat data harus terdistribusi normal dan memiliki varian yang homogen. Untuk menguji normalitas distribusi digunakan uji Kolmogorov-Smirnov dan untuk menguji homogenitas varian digunakan uji Levene. Data yang homogen dan terdistribusi normal diolah menggunakan uji ANOVA satu arah. Jika terdapat perbedaan bermakna secara statistik ($p \leq 0.05$), dilakukan uji lanjutan menggunakan uji perbandingan multipel LSD.

Pada data yang tidak memenuhi syarat untuk analisis keragaman ANOVA dilakukan transformasi data dan jika tetap tidak memenuhi syarat akan dianalisis menggunakan uji non parametrik Kruskal Wallis. Jika terdapat perbedaan bermakna ($p \leq 0,05$) dilakukan uji lanjutan dengan uji perbandingan Mann Whitney.

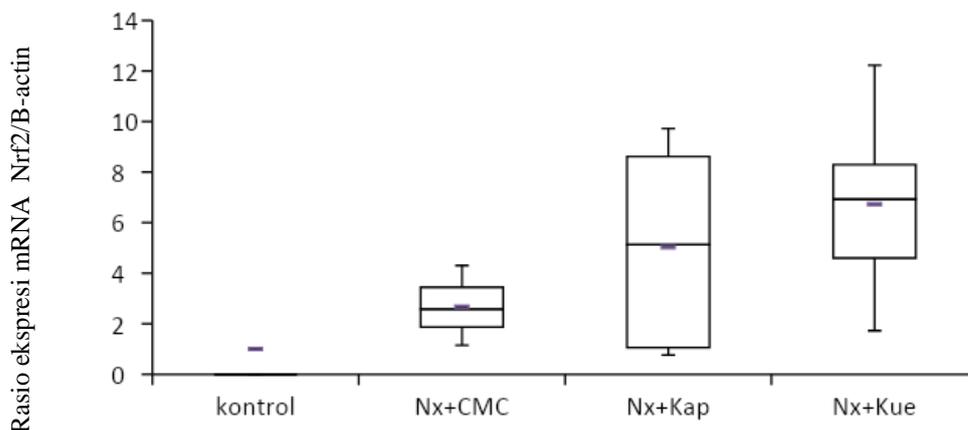
HASIL DAN PEMBAHASAN

Rasio ekspresi mRNA gen Nrf2 didapatkan dengan perhitungan menggunakan metode Livak (Livak, 2001). Nilai rasio ekspresi ini tidak memenuhi syarat untuk dilakukan analisis secara parametrik menggunakan ANOVA satu arah karena uji homogenitasnya sebesar 0,001 dengan uji

normalitas untuk kelompok yang dilakukan nefrektomi 5/6 dengan pemberian CMC 0,5% adalah 0,897, untuk kelompok yang dilakukan nefrektomi 5/6 dengan pemberian kaptopril 0,039 dan kelompok yang di-

lakukan nefrektomi 5/6 dengan pemberian kuersetin sebesar 0,967.

Hasil analisis non parametrik menggunakan Kruskal-Wallis rasio ekspresi mRNA Nrf2 sebagai berikut :



Gambar 1. Grafik Rasio Ekspresi Nrf2

Tabel 1. Hasil Uji Statistik

Median	1	2.580976	5.126868	6.926824
Min	1	1.150225	0.761017	1.722893
Maks	1	4.307697	9.716926	12.22489
P (kontrol)	-	0.006	0.305	0.002
P (Nx+CMC)	0.006	-	0.796	0.121
P (Nx+Kap)	0.305	0.796	-	0.522
P (Nx+Kue)	0.002	0.121	0.522	-

Keterangan: *Kontrol*: hewan uji yang tidak mendapatkan perlakuan, *Nx+CMC*: kelompok hewan uji yang dilakukan nefrektomi 5/6 dan mendapatkn CMC 0,5%, *Nx+Kap*: Kelompok hewan uji yang dilakukan nefrektomi 5/6 dan mendapatkan kaptopril, *Nx+Kue*: kelompok hewan uji yang dilakukan nefrektomi 5/6 dan mendapatkan kuersetin.

Hasil analisis statistik ekspresi mRNA Nrf2 menggunakan uji Kruskal-Wallis pada seluruh kelompok uji berbeda bermakna ($p=0,039$) dengan analisis Mann Whitney

perbedaan bermakna tersebut terdapat antara kelompok Kontrol dengan Nx+CMC ($p=0,006$) dan antara kelompok kontrol dengan Nx+Kuersetin ($p=0,002$).

Tabel 2. Rerata Cq β -actin dan Nrf2

Kelompok	B-actin	Nrf2
Kontrol	340.635	33.295
	337.285	33.552
	32.249	326.135
	349.185	352.185
	35.05.00	34.116
	312.565	322.675
Nx+CMC	335.955	33.274

	35.941	34.44.00
	34.716	32.535
	353.265	36.019
	35.826	326.085
Nx+Kap	36.333	326.365
	356.495	32.442
	36.612	361.165
	352.415	34.905
	36.376	34.518
	344.075	333.635
Nx+Kue	339.435	33.733
	337.345	32.868
	37.709	336.435
	42.708	35.586

Keterangan : Kontrol : kelompok yang tidak mendapatkan perlakuan, Nx+CMC : kelompok hewan uji yang dilakukan nefrektomi 5/6 dan diberi CMC 0,5%, Nx+Kap : kelompok hewan uji yang dilakukan nefrektomi 5/6 dan diberi kaptopril 10mg/kgBB, Nx+Kue : kelompok hewan uji yang dilakukan nefrektomi 5/6 dan diberi kuersetin 100mg/kgBB.

Model eksperimental yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus galur *Sprague Dawley* yang diinduksi dengan nefrektomi 5/6 sehingga mengalami PGK. Pemilihan nefrektomi 5/6 karena didasarkan pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Soetikno (2014) yang menunjukkan bahwa nefrektomi 5/6 dapat memicu progresivitas PGK dan dapat menginduksi kerusakan struktur dan fungsi ginjal. (Soetikno, 2014). yang dibuktikan dengan adanya proteinuria, penurunan klirens kreatinin, peningkatan BUN, dan kerusakan struktur dari ginjal yang masih tersisa. Proses tersebut berkaitan dengan patogenesis stres oksidatif, inflamasi, dan fibrosis (Halliwell, 2006).

Nefrektomi 5/6 menyebabkan terjadinya kehilangan nefron dalam jumlah besar yang akan menimbulkan reaksi kompensasi berupa hiperfiltrasi. Reaksi kompensasi ini akan meningkatkan tekanan intraglomerulus dan menimbulkan kerusakan barier permeabilitas glomerulus. Keadaan ini menyebabkan protein akan lebih mudah keluar dari pembuluh darah /menuju ruang bowman (*bowman space*). Selanjutnya

protein yang berada di dalam lumen tubulus akan direabsorpsi. Banyaknya protein yang berada di dalam lumen akan meningkatkan aktivitas reabsorpsi tubulus. Peningkatan aktivitas tubulus yang berlebihan akan memicu terjadinya inflamasi (Levey, 2005).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perlakuan nefrektomi 5/6 mengakibatkan terjadinya proteinuria yang merupakan salah satu manifestasi dari kerusakan ginjal. Proteinuria juga merupakan penanda progresivitas pada PGK. Proteinuria yang terjadi menunjukkan bahwa kerusakan pada barier kapiler glomerulus menyebabkan banyak protein terdapat di dalam tubulus kemudian memicu aktivitas komplemen sehingga memperluas proses inflamasi hingga tubulointerstisial (Kuo, 2010).

Kreatinin plasma merupakan salah satu faktor untuk menilai fungsi ginjal. Pada PGK, penurunan fungsi ginjal yang terjadi akan mengakibatkan peningkatan kreatinin plasma karena kemampuan filtrasi ginjal menurun. Dari hasil penelitian didapatkan bahwa perlakuan nefrektomi 5/6 mengakibatkan terjadinya peningkatan kadar

kreatinin plasma.

Hasil penelitian menemukan adanya peningkatan derajat fibrosis yang bermakna pada perlakuan 5/6 nefrektomi. Hal ini dapat menggambarkan bahwa perlakuan 5/6 nefrektomi pada penelitian ini dapat memicu proses inflamasi. Molekul-molekul inflamasi ini menimbulkan akumulasi matriks ekstrasel. Proses inflamasi ini juga akan menghasilkan ROS yang akan memicu stres oksidatif. Akan tetapi pada penelitian ini tidak disertai dengan peningkatan stres oksidatif yang berarti bahwa ginjal yang tersisa masih dapat melakukan kompensasi dengan meningkatkan pertahanan antioksidan endogen.

Berdasarkan hipotesis pada penelitian ini diharapkan kuersetin dapat menghambat progresivitas PGK kronik melalui sifatnya sebagai antioksidan, akan tetapi pada penelitian ini sendiri perlakuan 5/6 nefrektomi belum menginduksi terjadinya stres oksidatif. Artinya penurunan fungsi ginjal dan kerusakan struktur yang tampak pada penelitian ini disebabkan karena peningkatan tekanan glomerulus akibat hiperfiltrasi dan pada akhirnya akan memicu inflamasi yang diikuti dengan kerusakan tubulus yang akan mengganggu fungsi dari glomerulus dan tubulus itu sendiri tapi belum disertai adanya stres oksidatif, sehingga kuersetin tidak efektif memperbaiki proteinuria, kreatinin, dan uremia, dan juga fibrosis. Selain itu, kemungkinan tidak efektifnya kuersetin pada penelitian ini dikarenakan dosis yang belum tepat untuk PGK yang diinduksi dengan 5/6 nefrektomi. Peningkatan proteinuria yang terjadi pada pemberian kuersetin pada kelompok NxQ akan mengakibatkan kerusakan tubulus sehingga akan mengganggu fungsinya dalam mensekresikan kreatinin dimana kreatinin selain difiltrasi juga akan disekresi oleh tubulus, sedangkan ureum selain difiltrasi oleh glomerulus juga akan direabsorpsi di tubulus, dimana reabsorpsi ureum tergantung pada kecepatan aliran filtrat, aliran filtrat

yang lambat akan memperbanyak reabsorpsi ureum. (Alrawaiq, 2014). Proteinuria yang meningkat juga dapat merupakan kondisi awal yang memicu fibrosis ginjal seperti telah dijelaskan sebelumnya.

SIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil dan uraian di atas, kekurangan dalam penelitian ini yaitu waktu pengamatan yang kurang lama setelah dilakukannya 5/6 nefrektomi, sehingga pada akhir penelitian belum ditemukan kondisi stres oksidatif yang nyata. Jika dibandingkan dengan penelitian sebelumnya oleh Kim dan Vaziri yang menilai stres oksidatif dan inflamasi pada minggu ke-6 dan ke-12 menunjukkan bahwa pada minggu ke-12 setelah ablasi ginjal, terjadi peningkatan stres oksidatif dan inflamasi yang dibuktikan dengan peningkatan yang signifikan dari NF- κ B, protein subunit NADPH oksidase, monocyte chemoattractant protein-1, cyclooxygenase-2, 12-lipoxygenase pada kelompok gagal ginjal kronik yang diinduksi dengan 5/6 nefrektomi. Sedangkan pada minggu ke-6 setelah ablasi ginjal, berbagai parameter di atas tidak menunjukkan perubahan yang signifikan. Selain itu juga dibuktikan dengan penurunan yang signifikan dari ekspresi Nrf2 yang diikuti penurunan berbagai enzim antioksidan endogen antara lain SOD, CAT, dan GPx pada minggu ke-12 setelah ablasi ginjal, sementara itu pada minggu ke-6 perubahan tersebut tidak begitu tampak. Selain pemeriksaan stres oksidatif, Kim dan Vaziri juga menilai fungsi ginjal termasuk kadar kreatinin dan ureum plasma dimana pada minggu ke-12 terjadi peningkatan yang lebih tinggi dibandingkan pada minggu ke-6 setelah ablasi ginjal (Modaresi, 2015).

Kelemahan lainnya dalam penelitian ini adalah tidak dilakukan pemeriksaan parameter yang berkaitan dengan inflamasi yang dapat menjelaskan kaitan inflamasi terhadap patogenesis PGK yang bermanifestasi pada penurunan fungsi dan

kerusakan struktur ginjal serta efek kuersetin sebagai antiinflamasi pada model PGK yang diinduksi dengan 5/6 nefrektomi. Dan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa kuersetin cenderung meningkatkan ekspresi mRNA Nrf2 jaringan ginjal tikus pascanefrektomi 5/6.

DAFTAR PUSTAKA

- Alrawaiq NS, Abdbullah A. (2014). A Review of Flavonoid Quercetin: Metabolism, Bioactivity and Antioxidant Properties. *International Journal of PharmTech Research*, 6(3), 933-941
- Canning P, Sorrel FJ, Bullock AN. (2015). *Structural basis of Keap1 interactions with Nrf2*. Elsevier. Free Radical Biology and Medicine.
- Cortinovis M, Ruggenenti P, Remuzzi G. (2016). *Progression, Remission and Regression of Chronic Renal Diseases*. Nephron Clinical practice.
- Culpepper RM, Schoolwerth AC. (1992). Remnant Kidney Oxygen Consumption: Hypermetabolism or Hyperbole?. *J.Am.Soc.Nephrol*, 3:151-156
- Egert S, et al. (2008). Daily Quercetin Supplementation Dose-dependently Increases Plasma Quercetin Concentrations in Healthy Humans. *The Journal of Nutrition*.
- Fogo AB. (2007). Mechanisms of Progression of Chronic Kidney Disease. *Pediatr Nephrol* 22:2011–2022
- Halliwell BB, Poulsen HE. (2006). *Cigarette Smoke and Oxidative Stress*. Springer.
- Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H, Levonen AL. (2013). *The Keap1-Nrf2 Pathway : Mechanisms of Activation and Dysregulation in Cancer*. Elsevier. Redox Biology 1: 45-49.
- Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK. (2009). Nrf:INrf2(Keap1) Signaling in Oxidative Stress. NIH Public Access. *Free Radical Biol Med*, 47(9), 1304-1309
- Kementrian Kesehatan RI. (2013). *Badan Penelitian dan Pengembangan*. Riskesdas. Jakarta
- Khattab MM, Mostafa A, Al-Shabanah O. (2005). *Effect of Captopril on Cardiac and Renal Damage, and Metabolic Alteration in the Nitric Oxide-deficient Hypertension Rat*. Kidney Blood Press.
- Kuo LK, Tarng DC. (2010). Oxidative Stress in Chronic Kidney Disease. *Adaptive Medicine* 2(2):87-94.
- Loyal K. (2015). *Efek Proteksi Kuersetin Terhadap Ginjal Tikus Model Penyakit Ginjal Kronik Melalui Jalur Nuclear Factor-erythroid-2 Related Factor 2 (nrf2)*. Universitas Indonesia.
- Lee YJ, Lee DM, Lee SH. (2015). Nrf2 Expression and Apoptosis in Quercetin-treated Malignant Mesothelioma Cells. *Mol Cells*, 38(5), 416-425
- Levey AS et al. (2005). Definition and Classification of Chronic Kidney Disease: a Position Statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int. Jun*, 67(6), 2089-100
- Livak KJ and Schmittgen TD. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔt} Method. *Methods*, 25 : 402-408
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. (2004). Polyphenols : Food Source and Bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*.
- Matovinovic MS. (2009). Pathophysiology and Classification of Kidney Disease. *eJIFCC*.
- McMillan JI. (2013). Chronic Kidney Disease (Chronic Kidney Failure). *Merck Manual Professional Version*.

- Modaresi A, Nafar M, Sahraei Z. (2015). Oxidative Stress in Chronic Kidney Disease. *IJKD*, 9, 165-79
- Morales AI, Sanchez CV, Sandoval JMS, Egido J, Mayoral P, Arevalo MA, et al. (2006). Protective Effect of Quercetin on Experimental Chronic Cadmium Nephrotoxicity in Rats Based on Its Antioxidant Properties. *Food and Chemical Toxicology*, (44), 2092-100
- Ong ACM, Leon G. (1994). Fine Loss of Glomerular Function and Tubulointerstitial Fibrosis: Cause or Effect? *Kidney International* (45), 345-351
- Pietta PG. (2000). *Flavonoid as antioxidant*. J Nat Prod.
- Pradeep A. (2016). *Chronic kidney Disease*. Medscape.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB. (1995). The Relative Antioxidant Activities of Plant-derived Polyphenolic Flavonoids. *Pubmed. Free Radic Res*, 22(4), 375-83
- Rieko Okada et al. (2013). *Pro-/anti-inflammatory Cytokine Gene Polymorphisms and Chronic Kidney Disease: a Cross-sectional Study*. BMC Nephrology
- Schnaper HW. (2014). Remnant Nephron Physiology and the Progression of Chronic Kidney Disease. *NIH Public Access*, 29(2)
- Serrano ABG, Martin MA, Bravo L, Goya L, Ramos S. (2009). *Quercetin Modulates Nrf2 and Glutathione-related Defenses HepG2 Cells Involvement of p38*. Institute of Food Science, Technology and Nutrition Spain.
- Small DM, Coombes JS, Bennet N, Johnson DW, Gobe GC. (2012). Oxidative Stress, Anti-oxidant Therapies and Chronic Kidney Disease. *Nephrology*, 17, 311-321
- Taguchi K, Motonashi H, Yamamoto M. (2011). Molecular Mechanism of the Keap1-Nrf2 Pathway in Stress Response and Cancer Evolution. *Journal Compilation. Genes to Cells*.
- Wang C, Pan Y, Zhang QY, Wang FM, Kong LD. (2012). *Quercetin and Allopurinol Ameliorate Kidney Injury in STZ-treated Rats with Regulation of Renal NLRP3 Inflammasome Activation and Lipid Accumulation*. Plos One.
- Weiner, DE. (2007). Causes and Consequences of Chronic Kidney Disease: Implications for Managed Health Care. *Journal of Managed Care Pharmacy*.
- Yang HC, Zuo Y, Fogo AB. (2010) Models of Chronic Kidney Disease. *Drug Discovery Today Dis Models*, 7(1-2), 13-19.