

**TELMISARTAN MENGHAMBAT PENINGKATAN KADAR TGF- β 1 AORTA
TIKUS (*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI NaCl 8%**

M. Ricky Ramadhian¹⁾

¹⁾Fakultas Kedokteran Universitas Lampung
Jl. Prof. Dr. Soemantri Brodjonegoro No. 1 Bandar Lampung 35145
Surel: rickyramadhian@gmail.com

ABSTRACT

The scientific literatures still debate that people should consume a low-salt diet. The relationship between salt intake, hypertension, cardiovascular, and kidney disease has been studied for a long time, but still provide unanswered questions. The fibrotic process is associated with renin-angiotensin-aldosterone system, transforming growth factor- β (TGF- β), connective tissue growth factor (CTGF), matrix metalloproteinases and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ). Telmisartan is antihypertensive drug that not only blocks angiotensin receptor but also leads to the decrease of blood pressure, activates PPAR- γ and presumeably inhibits expression of TGF- β 1. The purpose of this study was to analyze the effect of telmisartan on TGF- β 1 aorta in rats induced by 8% NaCl. Twenty five male Wistar 2,5-3 months of age and 100-150 g BW rats were used. They were grouped into 5, each contain of rats. Group I (G I) as placebo did not receive NaCl 8% nor telmisartan. G II received NaCl 8% only. G III, IV and V received NaCl 8% and telmisartan 3, 6 and 12 mg/ kg BW. The treatments was given every day for 8 weeks. The concentration of TGF- β 1 was measured by enzyme linked immunoabsorbent assay technique. Data were analyzed using oneway ANOVA test followed by a post-hoc test Aorta TGF- β 1 concentration were higher in aorta of NaCl 8% only male Wistar rats comparing to telmisartan-given male Wistar rats. Aorta TGF- β 1 concentration were higher in aorta of NaCl 8% only male Wistar rats comparing to telmisartan-given male Wistar rats.

Keywords: aorta, collagen, male rats, NaCl, TGF- β , Telmisartan.

ABSTRAK

Hubungan konsumsi garam, hipertensi, penyakit kardiovaskuler, dan penyakit ginjal masih memberikan pertanyaan yang belum terjawab terhadap peranan garam dalam patogenesis hipertensi, kardiovaskuler dan ginjal. Telmisartan obat antihipertensi mempunyai fungsi tidak hanya memblokir reseptor angiotensin tetapi juga mengaktifkan PPAR- γ dan diduga menghambat TGF- β 1. Tujuan penelitian ini untuk mengungkapkan pengaruh pemberian telmisartan terhadap TGF- β 1 aorta pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi dengan NaCl 8%. Sebuah penelitian eksperimental menggunakan 25 ekor tikus Wistar jantan usia 2,5-3 bulan, berat 100-150 g secara acak sederhana dibagi 5 kelompok masing-masing 5 ekor. Kelompok I (K I) tidak diberi NaCl, K II diberi NaCl 8% /hari, K III, IV dan V diberi NaCl 8% dan telmisartan berturut-turut 3, 6 dan 12 mg/kg BB/hari selama 8 minggu. Pengukuran TGF- β 1 pada aorta diukur dengan teknik *enzyme linked immunosorbent assay*. Data kemudian dianalisis menggunakan *One way ANOVA* diikuti tes post-hoc. Konsentrasi TGF- β 1 aorta lebih tinggi pada



kelompok NaCl 8% saja dibandingkan dengan kelompok perlakuan telmisartan tikus Wistar jantan. Telmisartan menghambat peningkatan ekspresi TGF- β 1 pada aorta tikus Wistar jantan yang diinduksi dengan NaCl 8%.

Kata kunci: aorta, NaCl, TGF- β , telmisartan, Wistar.

PENDAHULUAN

Konsumsi garam di dunia yang dianjurkan oleh WHO pada masyarakat secara umum kurang dari 5 gram per hari (World Health Organization, 2012). Dimana konsumsi garam tinggi pada merupakan faktor lingkungan utama yang menyebabkan hipertensi. Beberapa literatur ilmiah masih memperdebatkan untuk mengkonsumsi rendah garam. Pemberian diet garam pada studi epidemiologi menunjukkan kaitan antara insidensi tekanan darah tinggi pada beberapa komunitas (Adeleye & Sofola, 2010). Hubungan antara konsumsi garam, hipertensi, penyakit kardiovaskuler, dan pe-nyakit ginjal sudah diteliti sejak lama, tetapi masih memberikan pertanyaan yang belum terjawab dan menimbulkan kontroversi terhadap peranan garam terhadap patogenesis hipertensi, kerusakan pada kardiovaskuler dan ginjal.

Penyakit jantung kongestif dan fibrosis ginjal dikaitkan dengan asupan NaCl tinggi pada manusia dan berbagai hewan model, tetapi mekanisme yang tepat yang mendasari hubungan ini belum diketahui (Susic & Frohlich, 2012). Proses fibrosis berhubungan dengan sistem renin angiotensin-aldosteron, transforming growth factor- β (TGF- β), faktor pertumbuhan jaringan ikat (connective tissue growth factor (CTGF), matriks metalloproteinase dan peroxisome proliferasi-activated receptor gamma (PPAR γ). Peroxisome proliferasi-activated receptor gamma merupakan nuclear receptor yang memiliki tiga subunit, yakni subunit α , β dan γ . Beberapa derivat lipid, terutama asam lemak tidak jenuh merupakan ligan dari reseptor ini. Aktivasi PPAR γ akan mencegah ikatan antara protein p-300 dengan protein Smad yang menyebabkan

penurunan produksi TGF- β 1 dan menurunkan kejadian fibrosis. Selain itu, PPAR γ akan mencegah ikatan antara protein Smad3 (R-Smad) dengan respon elemendan protein Co-Smad sehingga akan menghambat produksi TGF- β 1 dan menurunkan kejadian fibrosis (Han et al., 2004).

Telmisartan merupakan angiotensin receptor blocker (ARB) yang unik disamping memiliki sifat menghambat reseptor angiotensin II tipe 1 (AT1), juga berfungsi sebagai agonis parsial PPAR γ (Goyal et al., 2011). Penelitian menunjukkan bahwa ligan PPAR γ (pioglitazon) dapat menurunkan produksi matriks ekstraseluler pada aorta tikus spontaneous hypertension rats (SHR), ligan PPAR γ lainnya seperti rosiglitazon, menghambat fibrosis vaskular pada tikus yang diinduksi angiotensin II (Gao et al., 2007; Gao et al., 2012). Telmisartan memiliki mekanisme kerja pada sistem angiotensinergik dan PPAR γ sehingga telmisartan diduga dapat berperan lebih optimal dalam mencegah terjadinya fibrosis organ (Attia et al., 2013). Penelitian Yu et al. menunjukkan NaCl 8% dapat menyebabkan fibrosis organ dan meningkatkan TGF- β 1 pada jantung dan ginjal tikus normotensi dan hipertensi. (Yu et al., 1998). Penelitian Yu et al. memberikan perlakuan tikus hanya dengan NaCl 8%, dalam penelitian diberi perlakuan dengan NaCl 8% dan telmisartan kemudian diukur kadar TGF- β 1 dengan metode ELISA. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian telmisartan terhadap kadar TGF- β 1 pada aorta tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi dengan NaCl 8%.

BAHAN DAN METODE

Desain penelitian eksperimental murni dengan rancangan penelitian ialah *post test only control group design*. Penelitian ini dilakukan selama 7 bulan dari bulan



Maret-September 2014. Lokasi penelitian di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada (FK UGM), Laboratorium Farmakologi dan Farmasi Klinis Fakultas Farmasi UGM, Laboratorium Patologi Anatomi FK UGM, Laboratorium Anatomi FK UGM, Laboratorium Parasitologi FK UGM dan Laboratorium Histologi dan Biologi Sel FK UGM.

Hewan coba dan perlakuan

Dalam penelitian ini digunakan 25 ekor tikus Wistar jantan usia 2,5-3 bulan, berat 100-150 gram dibagi dalam 5 kelompok masing-masing 5 ekor.

Besar sampel penelitian dihitung dengan menggunakan rumus Federer (1963) :

$$(n-1) \times (t-1) \geq 15$$

$$(n-1) \times (5-1) \geq 15$$

$$n-1 = 15 / 4$$

$$n = 3,75 + 1$$

$$n = 4,75 \text{ (pembulatan } n=5)$$

Keterangan :

n: jumlah sampel

t : jumlah perlakuan = 5

Didapatkan bahwa jumlah minimum sampel tiap kelompok ialah 5 ekor tikus.

Hewan coba dikandangkan dalam dalam kandang individu dan diberi makan berupa pellet serta diberi air minum secukupnya. Diletakkan dalam ruang bersuhu 20-24°C, siklus gelap-terang selama 12 jam. Sebelum dilakukan perlakuan, hewan coba dilakukan aklimatisasi selama 7 hari. Kelompok I (kontrol negatif) tidak diberikan NaCl 8% dan telmisartan, K II diberi NaCl 8% saja tanpa telmisartan, K III, IV dan V diberi NaCl 8% dan telmisartan berturut-turut 3, 6 dan 12 mg/kg BB tiap hari, selama 8

minggu. Pada minggu ke-8 tikus dikorbankan dengan cara dislokasi leher dan diambil aorta.

Protokol eksperimen

Tikus secara acak sederhana dikelompokkan ke dalam 5 kelompok : Kelompok I (kontrol negatif) tidak diberikan NaCl 8% dan telmisartan, K II diberi NaCl 8% saja tanpa telmisartan, K III, IV dan V diberi NaCl 8% dan telmisartan berturut-turut 3, 6 dan 12 mg/kg BB tiap hari, selama 8 minggu. Telmisartan 40 mg digerus dengan mortal sampai halus. Telmisartan ditambahkan aquades sampai volume 40 mL, kemudian digoyang sampai merata di dalam botol sehingga terbentuk suspensi telmisartan. Suspensi telmisartan diambil dengan spuit injeksi (alat sonde) sesuai dengan dosis tikus yang telah ditentukan untuk dimasukkan langsung ke dalam lambung tikus. Pada minggu ke-8 tikus dikorbankan dengan cara dislokasi leher dan diambil aorta.

Analisis TGF- β 1

Supernatan diambil untuk pengukuran TGF- β 1

Pembuluh darah aorta telah diisolasi dibilas dalam larutan NaCl 0,9% (normal salin) untuk menghilangkan darah dan ditempatkan pada kain steril. 10-20 mg jaringan dikumpulkan, dicampur dengan protein ekstraksi buffer, digerus halus, untuk mendapatkan lisat jaringan. Sampel disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 20 menit, supernatan diambil untuk dilakukan pengukuran TGF- β 1. *Transforming growth factor- β 1* dilakukan pengukuran pada setelah minggu ke-8, dengan *enzyme-linked immunosorbent assay* TGF- β 1 diukur dengan menggunakan TGF- β 1 ELISA kit untuk tikus (Booster Immunoleader, USA) mengikuti protokol yang tersedia (Boster Biology Technology Co. Ltd, no date).

Pembuatan larutan standar dan pembacaan dengan ELISA reader

Pembuatan larutan standar 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 dan 15,625 pg/mL. Larutan standar yang telah dibuat kemudian dimasukkan masing-masing 100 μ L ke dalam sumuran. Sampel dimasukkan ke dalam sumuran masing-masing 100 μ L, dimana pemeriksaan dilakukan duplo. Sumuran yang telah diisi dengan standar dan sampel diinkubasi pada suhu 37°C, selama 90 menit. Setelah diinkubasi, mikroplate dikosongkan, *antibody anti rat TGF- β 1 working solution* 100 μ L ditambahkan ke masing-masing sumuran, selanjutnya mikroplate ditutup dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit. Setelah diinkubasi, mikroplate dicuci 3x dengan PBS 0,01 M selanjutnya *ABC working solution* 100 μ L ditambahkan pada tiap sumuran, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Kemudian mikroplate dikosongkan dan dicuci 5x dengan PBS 0,01 M kemudian *TMB colour* 100 μ L ditambahkan pada tiap sumuran, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit. Tahap terakhir 100 μ L *TMB stop solution* ditambahkan pada tiap sumuran, kemudian mikroplate dimasukkan ke ELISA reader dengan panjang gelombang 450 nm untuk mendapatkan nilai OD (*optical density*) TGF- β 1 dari tiap sumuran.

Analisis Statistik

Data dalam bentuk rerata \pm standar deviasi. Data dianalisis dengan uji parametrik (*One-way ANOVA*) yang diikuti oleh post hoc tes atau tes non-parametrik (*Kruskal-Wallis*). Hasil nilai $p < 0,05$ dianggap signifikan secara statistik.

Kaji etik

Persetujuan etika untuk penelitian ini diperoleh dari komite etik penelitian, *Medical And Health Research Ethics Committee (MHREC), Faculty Of Medicine, Gadjah Mada University - Dr. Sardjito General Hospital.*

HASIL DAN PEMBAHASAN

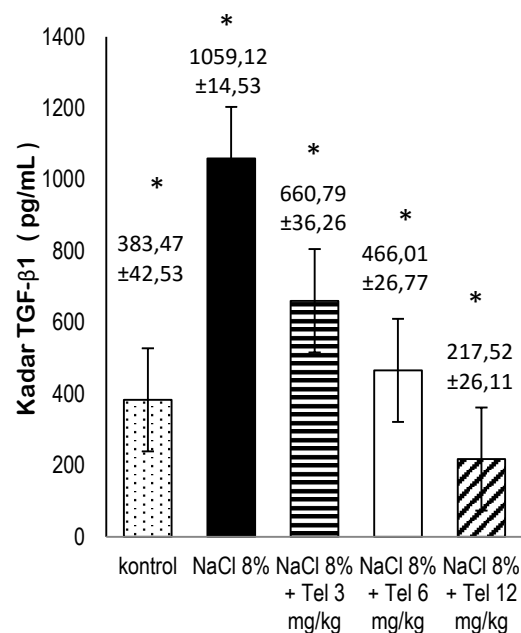
One-way ANOVA menunjukkan bahwa ada perbedaan yang signifikan pada rerata TGF- β 1 ($p < 0,05$). Uji *post hoc* menemukan perbedaan yang signifikan antara semua kelompok perlakuan ($p < 0,05$) dapat dilihat pada Gambar 1 dan Tabel 1.

Tabel 1. Kadar TGF- β 1 pada aorta tikus

| Kelompok | Mean \pm SD (pg/mL) | P |
|----------|----------------------------------|------|
| I | 383,47 \pm 42,02 ^a | 0,00 |
| II | 1059,12 \pm 14,53 ^b | |
| III | 660,79 \pm 36,26 ^c | |
| IV | 466,01 \pm 26,77 ^d | |
| V | 217,52 \pm 26,11 ^e | |

p: menggunakan *one way ANOVA*

Huruf *superscript* yang berbeda menunjukkan $p < 0,05$



Gambar 1. Kadar TGF- β 1
 Uji One way ANOVA $p < 0,05$
 * $p < 0,05$

Pada Gambar 1 dan Tabel 1 menunjukkan bahwa ada perbedaan dalam tingkat TGF- β 1 dalam aorta yang diinduksi telmisartan dengan dosis 12 mg/kgBB memiliki potensi paling tinggi dalam menurunkan kadar TGF- β 1 ($p < 0,05$). Sitokin dan faktor pertumbuhan yang diyakini berkontribusi pada induksi fibrosis yaitu TGF- β , IL-1, TNF- α dan PDGFs (Pohlers *et al.*, 2009). Ying *et al.* menunjukkan bahwa konsumsi garam 8% menyebabkan terjadinya peningkatan ekspresi TGF- β 1 pada korteks ginjal tikus (Ying *et al.*, 2009). Telmisartan memblok reseptor angiotensin, tetapi juga dapat berperan sebagai agonis parsial PPAR γ (Ikejima *et al.*, 2008). Angiotensin II dapat menstimulasi produksi TGF- β dan *plasminogen activator inhibitor-1* (Vaughan, 2006). Pada penelitian ini melihat dari protein TGF- β 1 pada aorta dengan metode ELISA, dimana mungkin diperlukan metode lain untuk dilakukan pemeriksaan TGF- β 1 dengan metode lain seperti kuantifikasi RNA dengan *real time* PCR.

Penelitian selanjutnya perlu dilihat protein lain yang terlibat dalam sinyal TGF- β 1 seperti protein Smad, dan reseptor TGF- β 1 perlu dikaji dan perlu dilakukan penginduksian hipertensi dengan metode lain apabila peneliti menargetkan pengaruh hipertensi terhadap fibrosis organ ataupun melihat efek kardiovaskular sehingga diketahui mekanisme kerjanya secara mendalam.

Conflict of interest

Tidak ada conflict of interest.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan banyak terima kasih kepada Prof. Dr. Mustofa., M.Kes., Apt., Dr. Muhammad Ghufro, dr. Dwi AA Nugrahaningsih, Ph.D, Prof. dr. Sofia Mubarika, M.Med.Sc., Ph.D dan semua staf yang telah membantu penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Adeleye O & Sofola O. 2010. Salt intake and mean arterial blood pressure in rabbits. *Science World Journal*. 5(3): 29–32.
- Attia YM, Elalkamy EF, Hammam OA, Mahmoud SS, & El-Khatib AS. 2013. Telmisartan, an AT1 receptor blocker and a PPAR gamma activator, alleviates liver fibrosis induced experimentally by *Schistosoma mansoni* infection, *Parasites & vectors*. *Parasites & Vectors*. 6(1): 199.
- Boster Biology Technology Co. Ltd. (no date). Rat TGF β 1 ELISA Kit. pp. 1–6. http://www.bosterbio.com/media/pdf/EK0514_DS.pdf.
- Federer WY. 1963. *Experimental Design: Theory and Application*. New York. Mac Millan.
- Gao D, Ning N, Hao G, & Niu X. 2012. Pioglitazone attenuates vascular fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *PPAR research*. 2012(856426): 1–7.
- Gao D, Niu X, Hao G, Peng N, Wei J, Ning N, & Wang NP. 2007. Rosiglitazone inhibits angiotensin II-induced CTGF expression in vascular smooth muscle cells—Role of PPAR-gamma in vascular fibrosis. *Biochemical Pharmacology*. 73: 185–197.
- Goyal SN, Bharti S, Bhatia J, Nag TC, Ray R, & Arya DS. 2011. Telmisartan, a dual ARB/partial PPAR- γ agonist, protects myocardium from ischaemic reperfusion injury in experimental diabetes. *Diabetes, Obesity & Metabolism*. 13(6): 533–41.
- Han C, Demetris AJ, Liu Y, Shelhamer JH, & Wu T. 2004. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) activates cytosolic phospholipase A2alpha (cPLA2alpha)-mediated prostaglandin E2 (PGE)2/EP1 and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma)/Smad signaling pathways in human liver cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 279: 44344–44354.
- Ikejima H, Imanishi T, Tsujioka H, Kuroi A, Kobayashi K, Shiomi M, Muragaki Y, Mochizuki S, Goto M, Yoshida K, & Akasaka T. 2008. Effects of telmisartan, a unique angiotensin receptor blocker with selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-modulating activity, on nitric oxide bioavailability and atherosclerotic change. *J. of hypertension*. 26(5): 964–72.
- Pohlert D, Brenmoehl J, Löffler I, Müller CK, Leipner C, Schultze-Mosgau S, Stallmach A, Kinne RW, & Wolf G. 2009. TGF-beta and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1792(8): 746–756.



- Susic D & Frohlich ED. 2012. Salt consumption and cardiovascular, renal ,and hypertensive diseases : clinical and mechanistic aspects. *Curr Opin Lipidol.* 23: 11–16.
- Vaughan DE. 2006. PAI-1 and TGF- β : unmasking the real driver of TGF- β -induced vascular pathology. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 26(4): 679–680.
- World Health Organization. 2012. *Guideline: Sodium intake for adults and children.* pp. 1–56.
- Ying W, Aaron K, Wang P, & Sanders PW. 2009. Potassium inhibits dietary salt-induced transforming growth factor- β production. *Hypertension.* 54(5): 1159–1163.
- Yu HCM, Burrell LM, Black MJ, Wu LL, Dilley RJ, Cooper ME, & Johnston CI. 1998. Salt induces myocardial and renal fibrosis in normotensive and hypertensive rats. *Circulation.* 98(23): 2621–2628.