

PENGARUH ASUPAN VITAMIN D TERHADAP PENURUNAN EKSPRESI COX-2 DI SEL MACULA DENSE GINJAL DALAM SISTEM PENGATURAN TEKANAN DARAH

Dessy Hermawan¹

ABSTRAK

Hipertensi masih merupakan penyakit yang mematikan. Angka kejadian hipertensi di Indonesia masih tinggi dan cenderung meningkat. Penelitian tentang hipertensi melaporkan vitamin D mampu menekan transkripsi gen renin yang kejadiannya di bagian down stream cAMP. Sedangkan di bagian berbeda di sel cancer, vitamin D mampu menghambat ekspresi COX-2 yang kejadiannya di bagian up stream cAMP. Hal ini yang menarik untuk mempelajari sasaran aksi vitamin D dalam penghambatan COX-2 di sel macula densa ginjal. Adapun tujuan penelitian ini adalah untuk Mempelajari sasaran aksi vitamin D dalam penghambatan COX-2 di sistem renin angiotensin-aldosteron dalam pengaturan tekanan darah.

Rancangan penelitian ini adalah eksperimen laboratorik dengan pre-post test group design. Subjek penelitian ini adalah 20 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan usia 2 bulan. Subjek dibagi menjadi lima kelompok perlakuan, yang masing-masing mendapat perlakuan berupa: diletakkan dalam kandang gelap dan diberi pakan tanpa vitamin D selama 7 hari. Kemudian subjek diletakkan dalam kandang terang dan diberi asupan vitamin D 1,22 - 0.5 µg/kg BB selama 4 hari. Sebagai pembanding ada kelompok yang tetap terus berada di kandang gelap selama penelitian dan ada yang diberi indometacin (penghambat COX-2). Data berupa persentasi ekspresi COX-2 dan tekanan darah sistolik sebelum dan sesudah perlakuan dikumpulkan dan dianalisis dengan menggunakan uji one way anova.

Hasil: sasaran aksi vitamin D pada system renin angiotensin aldosteron kemungkinan ada di dua bagian, yaitu ada yang dibagian up stream cAMP dengan menekan ekspresi COX-2 di sel macula densa ginjal dan ada yang dibagian down stream cAMP, yaitu dengan menekan langsung gen yang mengkode renin. Sehingga dapat disimpulkan: vitamin D mampu menghambat ekspresi COX-2 di sel macula densa ginjal.

Kata Kunci: hipertensi, COX-2, vitamin D, tekanan darah sistolik

PENDAHULUAN

Hipertensi merupakan penyakit yang diderita 30 % dari populasi orang dewasa di Amerika (Onk dkk, 2007), dan angka kejadiannya cenderung mengalami meningkat. Jika ada empat orang dewasa berkumpul, maka diduga satu orang diantaranya menderita hipertensi tanpa disadarinya. Data menunjukkan di Amerika ada 9,2 % orang terdiagnosis hipertensi pada orang yang datang ke dokter/tenaga kesehatan tanpa keluhan hipertensi (Ma J & Stafford, 2008). Hipertensi dapat menimbulkan komplikasi berupa penyakit kardivaskuler, jantung koroner, gagal jantung, gagal ginjal, kelahiran prematur hingga kematian. Bahkan sampai saat ini penyebab tersering hipertensi (90%) belum diketahui dengan pasti (Smeltzer & Bare, 2002).

Penelitian akhir-akhir ini melaporkan bahwa ditemukan kadar vitamin D yang rendah pada penderita hipertensi (Li, 2007; Forman dkk, 2007; Martini dkk, 2008). Kekurangan vitamin D dalam darah bukan hanya dapat menyebabkan peningkatan tekanan darah, tapi dalam waktu yang cukup lama juga dapat menyebabkan terjadinya arteriosklerosis (Weng dkk, 2013). Penelitian lain melaporkan bahwa pemberian vitamin D dapat

menurunkan produksi renin dengan menekan langsung produksi renin di ginjal, hanya saja mekanismenya belum dapat diterangkan dengan pasti. Diduga vitamin D langsung menekan gen yang mengkode renin (Li dkk, 2002), sehingga mengganggu proses transkripsi pembentukan gen renin. Baik (Li, 2007) maupun (Yuan dkk, 2007) menduga sasaran kerja dari vitamin D ada di bagian down stream cAMP, yaitu mengganggu proses transkripsi gen renin.

Pada bagian yang berbeda, di sel kanker, dilaporkan bahwa vitamin D juga mampu menghambat perkembangan sel kanker dengan menekan ekspresi COX-2, menghambat kerja reseptor prostaglandin dan mengaktifkan enzim 15-Prostaglandin Dehidrogenase (15-PDH), yang kesemuanya terjadi di bagian up stream cAMP (Krishnan & Feldman, 2010). Karena mekanisme kerja vitamin D, dalam sistem pengaturan tekanan darah dan sel kanker memiliki banyak kesamaan, maka menimbulkan pertanyaan, apakah dalam sistem pengaturan tekanan darah, vitamin D hanya menekan proses transkripsi gen renin saja?, seperti yang dilaporkan (Li, 2007) & (Yuan dkk, 2007), atau juga mampu menghambat ekspresi COX-2 di sel macula densa ginjal?. Jika vitamin D mampu

1. Prodi Keperawatan Fakultas Kedokteran Universitas Malahayati B. Lampung

menghambat ekspresi COX-2, maka proses perubahan asam arakhidonat menjadi prostaglandin tidak terjadi, sehingga tidak ada prostaglandin yang akan mengaktifkan cAMP di sel juxtaglomerular dan hasil akhirnya tidak akan ada produksi renin.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini adalah penelitian eksperimen laboratorik sederhana dengan rancangan pre post test group design yang mencoba mempelajari pengaruh pemberian vitamin D terhadap ekspresi COX-2 di sel macula densa ginjal dan tekanan darah sistolik hewan coba. Subjek dalam penelitian ini adalah 20 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan usia 8 minggu yang diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian

Terpadu Universitas Gadjah Mada (LPPT UGM) Yogyakarta. Pemeliharaan dan perlakuan serta pengukuran tekanan darah sistolik hewan coba dilakukan di laboratorium hewan coba Pusat Antar Universitas (PAU) UGM Yogyakarta, sedangkan pengukuran ekspresi COX-2 dilakukan di laboratorium PA FK UGM Yogyakarta.

Subjek dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan (K1 – K5) yang masing-masing akan mengalami perlakuan berupa penghilangan asupan vitamin D selama 7 hari dan pemberian kembali asupan vitamin D selama 4 hari, perlakuan didasarkan laporan penelitian sebelumnya yang melaporkan 7 hari penghilangan asupan vitamin D sudah mampu meningkatkan tekanan darah sistolik (TDS) secara bermakna dan 4 hari pemberian vitamin D telah mampu meningkatkan kembali TDS seperti semula (Hermawan dkk, 2012). Perlakuan secara lengkap terlihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Perlakuan untuk masing-masing kelompok perlakuan

Kelompok	Penghilangan asupan Vit D	Pemberian asupan Kembali Vit D
K1 (kontrol -)	Diletakkan dalam kandang gelap & diberi pakan tanpa vitamin D selama 7 hari	Tetap diletakkan dalam kandang gelap & diberi pakan tanpa vitamin D selama 4 hari
K2	Diletakkan dalam kandang gelap & diberi pakan tanpa vitamin D selama 7 hari	Diletakkan kembali dalam kandang terang dan diberi pakan standar serta diberi asupan vitamin D peroral sebanyak 0,125 µg/kg/hari selama 4 hari
K3	Diletakkan dalam kandang gelap & diberi pakan tanpa vitamin D selama 7 hari	Diletakkan kembali dalam kandang terang dan diberi pakan standar serta diberi asupan vitamin D peroral sebanyak 0,25 µg/kg/hari selama 4 hari
K4	Diletakkan dalam kandang gelap & diberi pakan tanpa vitamin D selama 7 hari	Diletakkan kembali dalam kandang terang dan diberi pakan standar serta diberi asupan vitamin D peroral sebanyak 0,5 µg/kg/hari selama 4 hari
K5 (Kontrol +)	Diletakkan dalam kandang gelap & diberi pakan tanpa vitamin D selama 7 hari	Tetap diletakkan dalam kandang gelap & diberi pakan tanpa vitamin D selama 4 hari serta di beri indomethacin 3 mg/Kg BB/hari selama 4 hari.

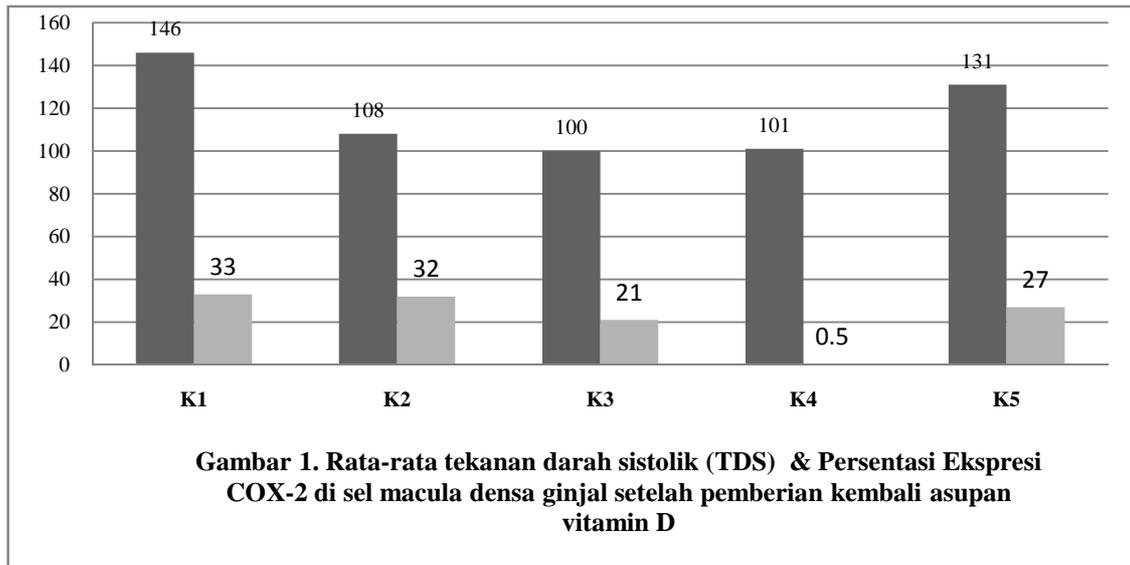
Untuk mempelajari pengaruh asupan vitamin D terhadap penurunan ekspresi COX-2 di sel macula densa ginjal dan penurunan tekanan darah sistolik, maka pada hari ke 7 dan 11 hewan coba di ukur TDS-nya. Tekanan darah diukur dengan menggunakan alat pengukur tekanan darah yang ada di laboratorium PAU UGM. Arteri yang digunakan untuk pengukur tekanan darah adalah arteri ekor tikus dan hanya tekanan darah sistolik saja yang dapat terbaca oleh alat tersebut.

Kemudian untuk mempelajari pengaruh pemberian kembali asupan vitamin D terhadap penurunan ekspresi COX-2 di sel macula densa ginjal, maka pada hari ke 11, hewan coba dikorbankan kemudian diambil ginjalnya dan difiksasi dengan larutan buffer formaline dan segera di bawa ke laboratorium untuk di buat preparat histologinya. Pembuatan dan pembacaan preparat

histology dengan metode imunohistokimia (IHC) dilakukan di laboratorium Patologi Anatomi (PA) FK UGM Yogyakarta. Khusus untuk kelompok K5 pada hari ke 8 hingga ke 11 diberi indomethacin 3 mg/Kg BB/hari, kelompok ini merupakan kelompok pembandingan (kontrol positif), karena diketahui bahwa indomethacin merupakan penghambat kuat untuk COX-2.

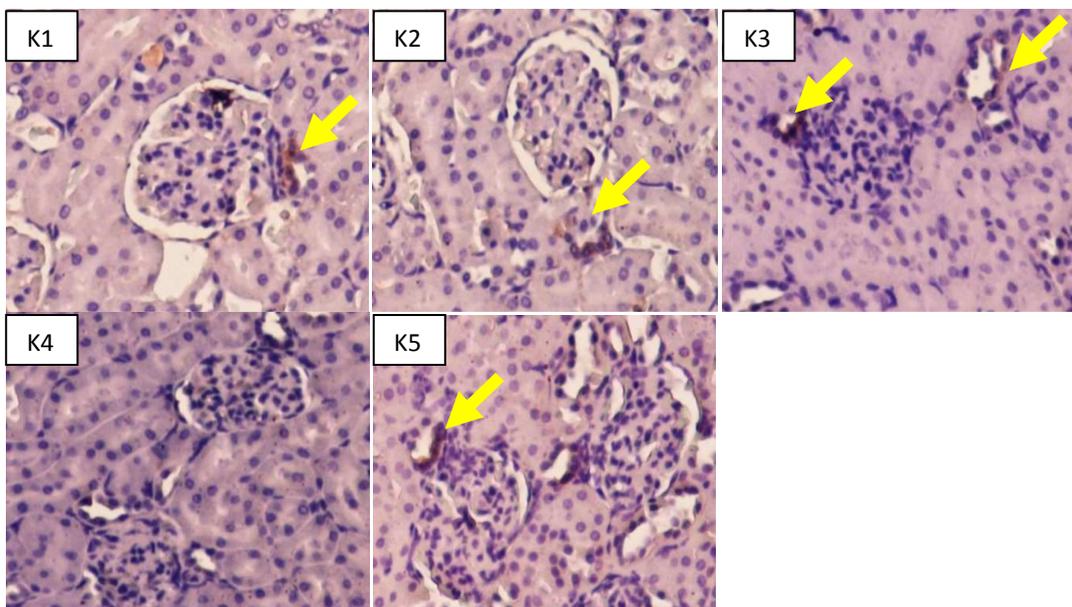
HASIL & PEMBAHASAN

Pada Gambar 1 tampak adanya penurunan tekanan darah sistolik setelah pemberian kembali asupan vitamin D dan meletakkan subjek penelitian di kandang terang selama empat hari.



Pada gambar 1 tampak adanya trend penurunan ekspresi COX-2 di sel macula densa dengan bertambahnya dosis vitamin D yang diberikan. Namun jika kita bandingkan ekspresi COX-2 pada K1 (33% ± 30,9) dengan K2(32,4% ± 36,9) tampak hanya ada penurunan yang sangat kecil, yaitu 0,6 %. Penurunannya juga tidak berbeda bermakna (p: 0,826). Demikian juga jika dibandingkan antara ekspresi COX-2 antara K1 dengan K3 (21,4% ± 40,3) belum ada penurunan yang bermakna (p: 0,071) dengan selisih penurunan ekspresi COX-2 sebesar 11,6%. Penurunan ekspresi COX-2 baru terlihat bermakna

(p:0,000) jika kita membandingkan antara K1 dengan K4 (0,54% ± 2,50) dengan selisih ekspresi COX-2 sebesar 32,5%. Pada K5 (27,5% ± 31,4), kelompok kontrol positif yang terus berada di kandang gelap dan pada empat hari terakhir diberi COX-2 inhibitor, menunjukkan ada sedikit penurunan ekspresi COX-2 sebesar 5,5% jika dibandingkan dengan K1. Penurunannya juga tidak bermakna secara statistik (p: 0,365). Untuk lebih memperjelas gambaran ekspresi COX-2 di sel macula densa pada setiap kelompok perlakuan terlihat pada Gambar 2 ini:



Gambar 2. Ekspresi COX-2 di sel Macula Densa Ginjal pada masing-masing kelompok

Pada gambar 2, tampak pada K1 adanya banyak terlihat sel macula densa ginjal yang terekspresi COX-2, hal ini terlihat dari selnya yang berwarna kecoklatan. Jumlah sel yang terekspresi COX-2 mulai berkurang

seiring dengan bertambahnya dosis vitamin D yang diberikan, bahkan pada kelompok yang diberi dosis vitamin D sebanyak 2 kali dari asupan normal (K4), hampir tidak ditemukan lagi (0,54%) sel macula densa yang terekspresi

COX-2. Jumlah sel yang terekspresi COX-2 justru meningkat kembali pada kelompok yang diberi indometacine (K5).

Variabel yang juga diamati dalam penelitian ini adalah tekanan darah sistolik (TDS). Pada gambar 1 tampak adanya trend penurunan tekanan darah sistolik akibat pemberian tambahan vitamin D, hal ini tampak jika dibandingkan TDS K1 ($146 \pm 3,68$ mmHg) dengan K2 ($108 \pm 2,36$ mmHg) yang telah diberi vitamin D sebanyak 0,125 µg/Kg BB/hari selama empat hari, menunjukkan ada penurunan sebesar 38 mmHg dengan penurunan yang bermakna ($p: 0,000$). Penambahan dosis menjadi 0,25 µg/Kg BB/hari selama empat hari menyebabkan penurunan tekanan darah yang makin besar yaitu 46 mmHg dan makin bermakna ($p: 0,000$), hal ini tampak jika kita membandingkan TDS K1 dengan K3 ($100 \pm 1,00$ mmHg). Namun penambahan dosis vitamin D yang diberikan tidak mampu menurunkan lagi TDS, hal ini terlihat pada TDS K4 ($101 \pm 1,89$ mmHg) yang berbeda bermakna dengan K1 ($p: 0,000$) namun penurunan TDS nya menjadi lebih rendah yaitu 45 mmHg. Selisih TDS terkecil (15 mmHg) didapat jika membandingkan TDS K1 dengan K5 ($131 \pm 2,06$ mmHg), walaupun perbedaannya masih bermakna secara statistik ($p: 0,000$).

PEMBAHASAN

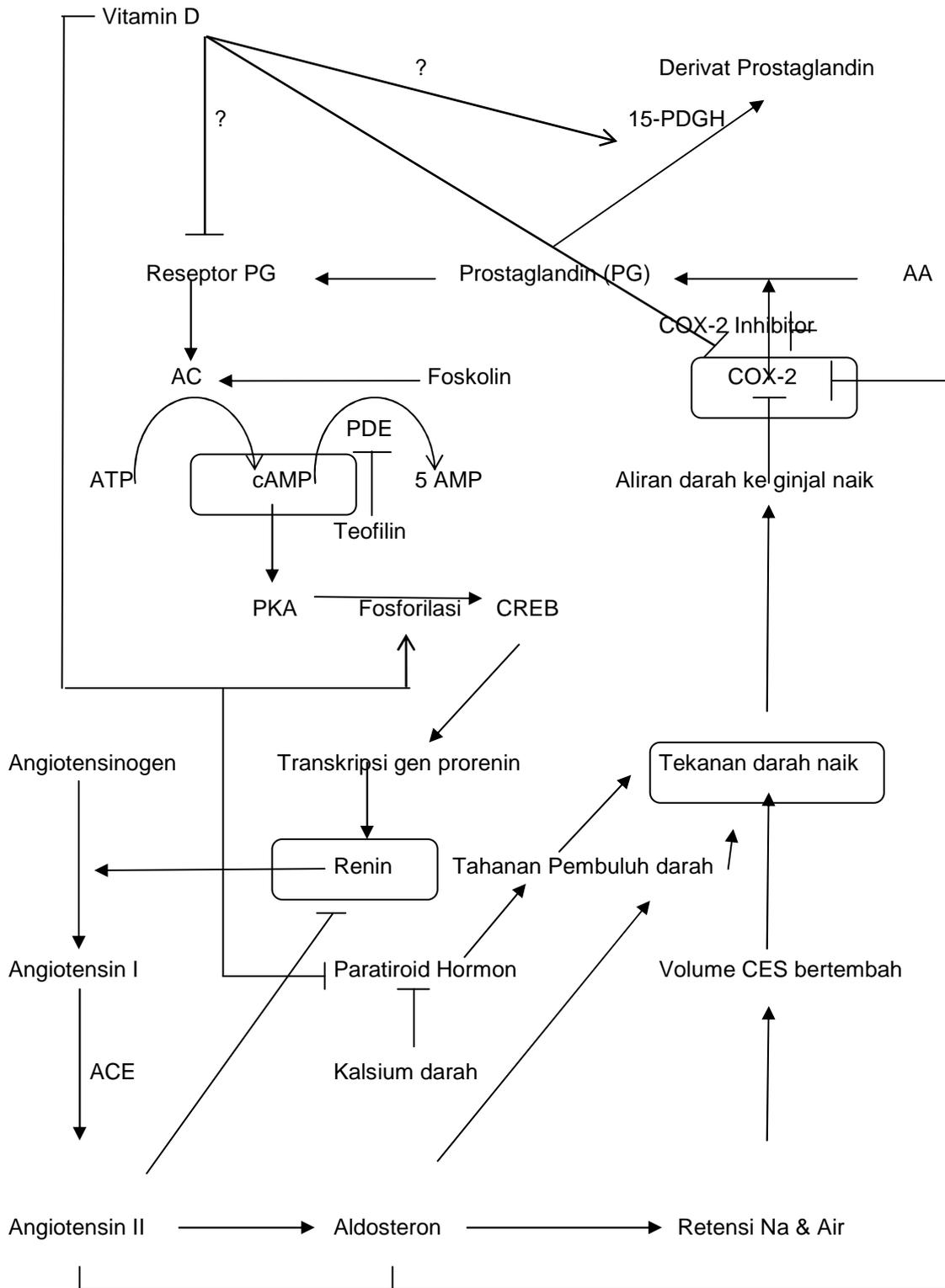
Pada Gambar 1, tampak bahwa ekspresi COX-2 di sel macula densa ginjal juga mampu dihambat dengan adanya vitamin D mulai kelompok yang diberi dosis vitamin D $\frac{1}{2}$ dari normal, tapi perlu vitamin D dua kali dosis (K4) untuk menghambat ekspresi COX-2 secara bermakna ($p: 0,000$). Hal ini menunjukkan bahwa vitamin D memiliki sasaran aksi juga di bagian up stream cAMP. Seperti kita ketahui bahwa COX-2 adalah enzim yang digunakan untuk mengubah asam arakhidonat menjadi prostaglandin di sel macula densa. Prostaglandin di sel macula densa akan dikirim ke sel juxtaglomerular dan akan menyebabkan teraktifasinya adenilat siklase serta cAMP, sehingga hasil akhirnya adalah peningkatan produksi renin dan peningkatan tekanan darah (Weng dkk, 2013; Yuan dkk, 2007, Hermawan dkk, 2012 & Haris 2006)

Hal ini sejalan dengan pendapat (Swarni dkk, 2007) serta (Krishnan & Feldman, 2010) yang melaporkan bahwa sasaran aksi vitamin D pada pencegahan perkembangan sel kanker ada di bagian up stream cAMP, yaitu dengan menurunkan ekspresi COX-2, menurunkan ekspresi reseptor prostaglandin dan meningkatkan kerja enzim 15 prostaglandin dehidrogenase (15-PDH).

Pendapat ini juga didukung oleh (14), melaporkan bahwa vitamin D menekan produksi COX-2 pada sel kanker sehingga dapat menurunkan prostaglandin yang selanjutnya dapat mencegah proses perkembangan sel kanker.

Pada kelompok K1 yang selama penelitian berada di kandang gelap, menunjukkan ekspresi COX-2 (33 %) di sel macula densa. Ekspresi COX-2 meningkat pada keadaan gelap-gelap, paling tinggi jika dibandingkan dengan kelompok lainnya (Gambar 1). Hal ini menunjukkan bahwa rendahnya kadar $1,25$ (OH) $_2$ D $_3$ dalam darah menyebabkan ekspresi COX-2 di sel macula densa mengalami peningkatan. Kondisi ini menunjukkan bahwa tidak adanya vitamin D menyebabkan tidak ada yang menekan ekspresi COX-2, sehingga ekspresi COX-2 pada kelompok ini (K1) paling tinggi. Data ini menguatkan dugaan bahwa adanya vitamin D dalam darah menyebabkan ekspresi dari COX-2 terhambat. Akibatnya asam arakhidonat tidak dapat diubah menjadi prostaglandin. Hal ini sejalan dengan yang dilaporkan oleh (Swarni dkk, 2007) serta (Krishnan & Feldman, 2010) hanya saja kejadian penghambatannya adalah di sel kanker, sedangkan dalam penelitian ini mekanisme penghambatan COX-2 oleh vitamin D terjadi di sel macula densa ginjal.

Pada Gambar 1 tampak penurunan ekspresi COX-2 yang disebabkan oleh pemberian vitamin D dua kali dosis pada K4 (0,54 %) bahkan terlihat lebih besar efeknya jika dibandingkan dengan kelompok yang diberi indomethacine K5 (27,5 %), hal ini menunjukkan bahwa vitamin D memiliki efek penekanan pada ekspresi COX-2 di sel macula densa ginjal yang lebih kuat dibanding indomethacine. Padahal indomethacine adalah bahan yang bersifat COX-2 inhibitor kuat, sehingga pemberian indomethacine diharapkan akan mampu menekan kerja dari COX-2. Kenyataan yang terjadi, mekanisme penghambatan ekspresi COX-2 antara vitamin D dan indomethacine, tampak lebih kuat mekanisme penghambatan COX-2 yang dilakukan oleh vitamin D. Pada kelompok yang diberi vitamin D dua kali dosis, tampak hampir tidak ada sel macula densanya yang masih mengekspresikan COX-2 (0,54%), sedangkan pada kelompok yang diberi indomethacine, masih relatif banyak yaitu sebesar 27,5 % sel macula densanya masih menunjukkan positif terekspresi COX-2, sehingga tampak berwarna kecoklatan (Gambar 2). Secara terinci hasil penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 3:



Gambar 3. Mekanisme Penghambatan Vitamin D dalam Sistem Renin Angiotensin-Aldosteron

Secara terinci, hasil penelitian ini dapat terlihat pada gambar 3. Sasaran aksi vitamin D dalam sistem renin-angiotensin-aldosteron tidak hanya pada penghambatan transkripsi renin saja, tapi juga ada pada penghambatan ekspresi COX-2 di sel macula densa ginjal (di bagian upstream cAMP). Jika ekspresi COX-2 di hambat, maka prostaglandin tidak terbentuk sehingga tidak ada yang

mengaktifkan cAMP di sel juxtaglomerular. Jika cAMP tidak teraktifasi, maka proses selanjutnya tidak akan berjalan, dengan kata lain tidak akan ada renin yang dibentuk, sehingga sistem renin-angiotensin-aldosteron tidak teraktifasi sehingga tekanan darah tidak akan mengalami peningkatan.

Dari gambar 3, penulis juga masih menduga ada sasaran aksi vitamin D yang lain dalam system renin angiotensi aldosteron, yaitu di duga vitamin D mampu menghambat kerja reseptor prostaglandin dan mengaktifkan enzim 15-PDH. Untuk itu diperlukan penelitian lebih lanjut untuk dapat menjawab dugaan tersebut.

SIMPULAN & SARAN

Berdasarkan dari hasil penelitian yang penulis lakukan dan mempertimbangkan pendapat peneliti sebelumnya maka dapat disampaikan bahwa mekanisme atau sasaran aksi vitamin D pada sistem renin angiotensin-aldosteron kemungkinan ada di dua bagian, yaitu ada yang dibagian up stream cAMP dengan menekan ekspresi COX-2 di sel macula densa ginjal dan ada yang dibagian down stream cAMP, yaitu dengan menekan langsung gen yang mengkode renin.

Untuk mendapatkan mekanisme kerja vitamin D pada sistem renin angiotensin-aldosteron yang jelas dan terinci, tentunya hasil penelitian ini masih memerlukan kajian lebih lanjut, untuk melihat apakah mekanisme hambatannya hanya di COX-2, atau juga ada di bagian lain, seperti di reseptor prostaglandin di sel juxtaglomerular ataupun di enzim 15-PDH.

DAFTAR PUSTAKA

- Aparna, R., Subhashini, J., Roy, K.R., Reddy, S., Robinson, M., Uskokovic, M.R., Reddy, G.V., & Reddanna, P., 2008, Selective Inhibition of Cyclooxygenase-2 (COX-2) by 1 α , 25-Dihydroxy-16-ene-23-yne-Vitamin D₃, a Less Calcemic Vitamin D Analog, *J. Cell Biochem.* 104 :1832-42.
- Forman JP, Giovannucci E, Holmes MD, Ferrari HAB, Tworoger SS, Willett WC, Curhan GC. Plasma 25-hydroxyvitamin D levels and risk of incident hypertension. *Hypertension* 2007;49(5):1063-9
- Harris, R.C., 2006, COX-2 and Kidney, *J Cardiovasc Pharmacol* : 47: S37 – S 42.
- Hermawan, D., Kadarsih, S., Sunarti, Astuti, I., & Agus, Z.A.N., Efek Asupan Vitamin D terhadap tekanan darah sistolik tikus putih (*Rattus norvegicus*), *Jurnal Gizi Klinik Indonesia* 2012, Vol 9 No.1: 10 – 15.
- Krishnan, A.V. & Feldman, D., 2010, Molecular Pathway Mediating the Anti-Inflammatory Effect of Calcitriol: Implication for Prostate Kanker Chemoprevention and Treatment, *J. Endocrinology* 17 R19-R38.
- Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF, Liu SQ, Cao LP. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest* 2002;110(2):229-38
- Li YC. Vitamin D regulation of the renin angiotensin system: mechanism and implication. [series online] 2007[cited 2011 July 20]. Available from: <http://www.unimet.edu/cin2007/>.
- Ma J & Stafford RS, Screening, Treatment and Control of Hypertension in US Private Physician Office 2003-2004, *Hypertension* 2008;51:1275-81
- Martini LA, Wood RJ. Vitamin D and blood pressure connection: update on epidemiologic, clinical, and mechanistic evidence. *Nutr Rev* 2008;66(5):291-7
- Ong KL, Cheung BM, Man YB, Lau CP & Lam KS. Prevalence awareness, treatment, and control of hypertension among US adults 1999-2004. *Hypertension* 2007; 49: 69-75
- Smeltzer SC, Bare BG. Textbook of medical-surgical nursing. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC; 2002
- Swami, S., Krishnan, A.K., Moreno, J., Bhattacharyya, R.B., Peehl, D.M. & Feldman, D., 2007, Calcitriol and Genistein Action to Inhibit the Prostaglandin Pathway: Potential Combination Therapy to Treat Prostate Kanker, *J. Nutr.* 137:205S-210S
- Weng, S., Sprague, J.E., Oh, J., Riek, A.E., Chin, K., Garcia, M & Mizrachi, C.B., 2013, Vitamin D deficiency induces high blood pressure and accelerates atherosclerosis in mice, *Journal Pone* 8 (1)es4625: 1 – 10.
- Yuan W, Pan W, Kong J, Zheng W, Szeto FL, Wong KE, Cohen R, Klopot A, Zhang Z, Li YC. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ suppresses renin gene transcription by blocking the activity of the cyclic AMP response element in the renin gene promoter. *Biol Chem* 2007;282(41):29281-30