

Efek Asam Klorogenat pada Ekspresi Mrna IL-6 dan CD86 Lobus Frontal Tikus Model Diabetes Mellitus

Fauziyatul Munawaroh^{1*}, Aisyah Amanda Hanif¹, Asri Ragil Kemuning¹, Iffa Mutmainah¹, Yenny Rachmawati¹, Naufal Muharam Nurdin^{1,2}

1. Fakultas Kedokteran, IPB University
2. Departemen Gizi Masyarakat, Fakultas Ekologi Manusia, IPB University

Korespondensi : fmunawaroh@apps.ipb.ac.id

ABSTRAK

Pendahuluan: Diabetes Mellitus (DM) merupakan penyakit kronik dengan berbagai komplikasi, salah satunya yaitu Ensefalopati Diabetikum (ED). Hiperglikemia pada DM akan mengakibatkan neuroinflamasi melalui jalur M1 proinflamatorik. Beberapa agen proinflamatori akan meningkat dengan aktifnya jalur ini, seperti IL-6. Neuroglia kemudian teraktivasi dan mengekspresikan CD86 pada membran sel. Asam klorogenat (CGA) merupakan senyawa polyphenol pada kopi yang memiliki efek antiinflamasi. Tujuan penelitian ini adalah untuk memperjelas efek CGA pada aktivasi mikroglia jalur M1 dengan melihat ekspresi mRNA IL-6 dan CD86 pada lobus frontal tikus dengan model DM.

Metode: 24 ekor tikus jantan secara acak dibagi menjadi enam kelompok yaitu : kontrol, DM 1,5 bulan dan DM 2 bulan, dan kelompok dengan pemberian CGA dengan tiga dosis berbeda (CGA1, CGA2, CGA3). Jaringan lobus frontal diambil untuk analisa ekspresi mRNA IL-6 dan CD86 menggunakan RT-PCR.

Hasil: Ekspresi mRNA IL-6 lobus frontal berbeda signifikan antara kelompok kontrol dengan DM1,5 ($p=0.010$); kontrol dengan DM2 ($p=0.001$); kelompok DM2 dengan CGA2 ($p=0.028$). Ekspresi mRNA CD86 lobus frontal terdapat perbedaan signifikan antara kelompok kontrol dengan semua kelompok DM, baik dengan CGA atau tanpa CGA ($p<0.05$). Kelompok DM2 berbeda signifikan dengan kelompok CGA2 ($p=0.000$) dan kelompok CGA3 ($p=0.000$).

Kesimpulan: Ekspresi mRNA penanda jaras proinflamatorik M1 (IL-6 dan CD86) pada neuroinflamasi lobus frontal akibat DM lebih rendah setelah pemberian CGA dengan dosis 25 mg/KgBB.

Kata Kunci: asam klorogenat; CGA; neuroinflamasi; diabetes mellitus

ABSTRACT

Introduction: Diabetes Mellitus (DM) is a chronic disease with various complications, one of which is Diabetic Encephalopathy (ED). Hyperglycemia in DM will result in neuroinflammation through the proinflammatory M1 pathway. Some proinflammatory agents will increase with the activation of this pathway, such as IL-6. The neuroglia is then activated and expresses CD86 on the cell membrane. Chlorogenic acid (CGA) is a polyphenol compound in coffee that has an anti-inflammatory effect. The purpose of this study is to clarify the effect of CGA on the activation of M1 pathway microglia by looking at the expression of IL-6 and CD86 mRNA on the frontal lobe of mice with a DM model.

Methods: 24 male rats were randomly divided into six groups, namely: control, 1.5-month DM and 2-month DM, and the group with CGA administration with three different doses (CGA1, CGA2, CGA3). Frontal lobe tissue was taken for analysis of IL-6 and CD86 mRNA expression using RT-PCR.

Results: Frontal lobe IL-6 mRNA expression differed significantly between the control group with DM1.5 ($p=0.010$); control with DM2 ($p=0.001$); DM2 group with CGA2 ($p=0.028$). Frontal lobe CD86 mRNA expression differed significantly between the control group and all DM groups, either with CGA or without CGA ($p<0.05$). The DM2 group differed significantly from the CGA2 group ($p=0.000$) and the CGA3 group

($p=0.000$).

Conclusion: *The expression of mRNA markers of proinflammatory vessels M1 (IL-6 and CD86) in frontal lobe neuroinflammation due to DM was lower after administration of CGA at a dose of 25 mg/KgBB.*

Keywords: *chlorogenic acid; CGA; neuroinflammation; diabetes mellitus*

PENDAHULUAN

Diabetes Mellitus (DM) adalah gangguan metabolisme yang disebabkan karena ketidakmampuan produksi insulin oleh pankreas atau resistensi oleh jaringan organ akhir dan menghasilkan kadar glukosa darah tinggi (hiperglikemia) atau peningkatan Hemoglobin Glikosilasi A1C (HbA1c), serta dapat diikuti oleh penurunan progresif fungsi sel beta pankreas (Giugliano et al., 2008; Glovaci et al., 2019). Diabetes Mellitus (DM) telah menjadi masalah kesehatan yang serius, dan merupakan penyebab kematian ketujuh di dunia. Diabetes Mellitus telah menyebabkan sebanyak 5.2 juta kematian di dunia dengan angka mortalitas 82.4 per 100.000 kasus pada tahun 2015 (Glovaci et al., 2019). DM adalah penyakit kronik yang dapat berkembang menjadi banyak komplikasi pada berbagai organ. Salah satu komplikasi yang paling berbahaya dari hiperglikemia kronik adalah *diabetic encephalopathy* yang ditandai oleh penurunan fungsi kognitif (Moheet et al., 2015). Hiperglikemia yang terjadi pada DM akan mengaktifkan jalur-jalur inflamasi seperti NF- κ B pada nukleus sehingga neuron akan mengekspresikan agen-agen proinflamatori seperti MCP-1 dan IL-6 (Sandireddy et al., 2014). Inflamasi pada neuron akan mengaktifkan sel glia (Yang dan Wang, 2015; Liu et al., 2018). Regio otak yang paling rentan rusak karena DM adalah pada hipokampus dan korteks frontal (Piatkowska-Chmiel et al., 2021).

Dalam keadaan fisiologis, mikroglia menunjukkan fenotip normal, namun pada keadaan tertentu, mikroglia dapat berubah menjadi fenotip "proinflamatorik (M1)" atau "antiinflamasi (M2)". Bergantung pada jenis aktivasi, mikroglia mengeluarkan banyak faktor tropik, sitokin, dan kemokin untuk membantu kelangsungan hidup neuronal. Molekul patogen seperti Lipopolisakarida (LPS) dan Interferon (IFN), atau agregat protein seperti Alfa-Synuclein (α -syn), merangsang mikroglia ke dalam fenotip proinflamatorik, yang kemudian melepaskan molekul inflamasi, seperti Reactive Oxygen Species (ROS) dan sitokin pro-inflamasi lainnya, termasuk Interleukin-1 (IL-1), inducible N iNOS, Tumor Necrosis Factor (TNF), dan lain-lain. Paparan mikroglia yang terus-menerus terhadap mediator inflamasi ini dapat menyebabkan kerusakan saraf. Sebaliknya, mediator seperti Transforming Growth Factor Beta (TGF- β), Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-10 (IL-10), dan Interleukin-13 (IL-13), menginduksi transisi fenotip mikroglia ke M2. Fenotip mikroglia M2 berkontribusi pada proses fagositosis, pembangunan kembali matriks ekstraselular, dan kelangsungan hidup neuronal dengan mengeluarkan faktor-faktor seperti Ym1 dan Fizz1 (Isik et al., 2023).

Fenotip M1 digunakan pada keadaan aktivasi klasik mikroglia. Aktivasi klasik merupakan garis pertahanan pertama tubuh berupa sifat proinflamatorik dan kemampuan membunuh mikroglia. Mikroglia mengeluarkan sitokin proinflamatorik (IL-1, IL-6, IL-12, IL-17, IL-18, IL-23, TNF, dan IFN) dan NO, juga kemokin, seperti ligan CC-kemokin 2 (CCL2), kemudian terpolarisasi menjadi fenotip M1. Selain itu, mikroglia menunjukkan penanda (*marker*) setelah aktivasi M1, seperti major histocompatibility complex class II (MHC II), inducible nitric oxide synthase (iNOS), CD86, cyclooxygenase-2 (COX2), dan molekul tambahan, seperti ROS, prostaglandin E2 (PGE2), dan *reactive nitrogen species* (RNS) (Isik et al., 2023).

Chlorogenic acid (CGA) atau asam klorogenat merupakan salah satu senyawa polyphenol pada kopi yang memiliki kandungan antioksidan terbanyak (Gonthier et al., 2003). CGA telah dilaporkan memiliki efek antioksidan dan antiinflamasi, salah satunya menghambat ekspresi mRNA kadar sitokin Interleukin-8 (IL-8) (Naveed et al., 2018). Penelitian juga melaporkan efek

neuroprotektif CGA pada gangguan memori dan pembelajaran yang diinduksi skopolamin pada mencit dan menemukan bahwa kopi instan kaya CGA tanpa kafein mampu melindungi dari gangguan belajar dan memori melalui mekanisme kolinergik dan antioksidan (Kwon et al., 2010). Beberapa studi pra-klinis yang dilakukan untuk menentukan efek CGA terhadap fungsi kognitif pada hewan pengerat juga menunjukkan bahwa CGA memiliki potensi untuk melindungi terhadap kerusakan syaraf yang diinduksi iskemia (Heitman dan Ingram, 2014). Namun sampai saat ini, mekanisme kerja CGA sebagai agen antiinflamatorik dan neuroprotektif tidak diketahui secara jelas pada jalur M1 maupun M2. Penelitian ini bertujuan memperjelas efek neuroprotektif CGA sebagai agen antiinflamatorik pada lobus frontal dengan model DM melalui jalur M1 dengan melihat ekspresi mRNA sitokin IL-6 yang merupakan marker produksi yang dikeluarkan ke ekstrasel dan fenotip CD86 yang merupakan marker membran sel.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian kuasi eksperimental dengan rancangan penelitian *post test only controlled group design* dengan subyek tikus spesies *Rattus Norvegicus* galur Wistar. Perhitungan besar sampel dihitung dengan rumus Frederer, dengan jumlah 6 kelompok dengan hasil minimal 4 hewan coba pada setiap kelompok. 24 ekor tikus jantan secara acak dibagi menjadi enam kelompok yaitu: kontrol, DM 1,5 bulan dan DM 2 bulan, dan 3 kelompok DM 2 bulan dengan pemberian CGA dengan tiga dosis berbeda, yaitu kelompok CGA1 (12,5 mg/kgBB), CGA2 (25 mg/kgBB), dan CGA3 (50 mg/kgBB).

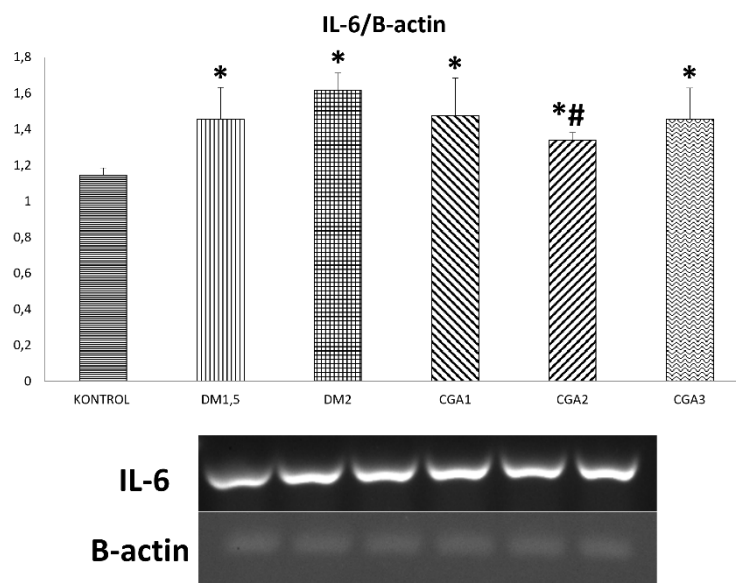
Tikus diletakkan kedalam kandang terpisah antar kelompok dan dipelihara di kandang milik Laboratorium Anatomi FK-KMK UGM. Tikus diberikan pakan standar AIN-93A dan minum air matang *ad libitum*. Induksi DM dilakukan dengan memberikan suntikan Streptozotocin dengan dosis 60 mg/kg dilarutkan dalam 0.1 M asam sitrat pH 4,5. Tikus dinyatakan DM apabila kadar glukosa yang lebih dari 250 mg/dL dengan pemeriksaan gula darah sewaktu dari vena ekor (*tail vein*).

Pemberian CGA diberikan secara injeksi intraperitoneal (i.p), dengan volume total maksimal 1 ml/kg berat badan. Larutan CGA dibuat dengan melarutkan CGA 12,5mg; 25mg, dan 50mg dalam 1 ml NaCl. Pemberian CGA dengan 3 variasi dosis yaitu : 12,5 mg/KgBB, 25 mg/KgBB dan 50 mg/KgBB. CGA diberikan pada tikus diabetes setiap hari selama 14 hari berturut-turut.

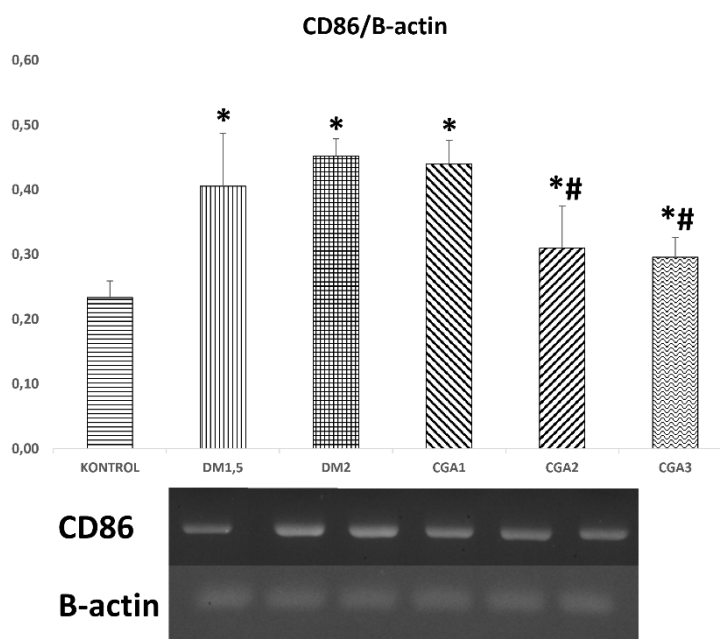
Setelah induksi model DM dan pemberian CGA, tikus kemudian di euthanasia dalam keadaan deep anesthesia. Jaringan lobus frontal kemudian diambil dan langsung disimpan dalam tabung 1,5 ml berisi RNA preservation solution kemudian disimpan pada suhu -20° C. Jaringan lobus frontal dipakai untuk ekstraksi RNA. Total RNA yang didapatkan sebagian disimpan pada suhu -20° C, sedangkan sebagian lain di ambil untuk digunakan dalam pembuatan cDNA yang selanjutnya digunakan untuk sampel Reverse-Transcriptase PCR.

Reverse-Transcriptase PCR dilakukan dengan sampel cDNA pada 2 gen, yaitu IL-6 dan CD86. GAPDH digunakan sebagai housekeeping gene. Hasil Reverse-Transcriptase PCR kemudian di lakukan elektroforesis. Produk PCR sebanyak 10 µl dimasukkan dalam masing-masing sumuran pada gel agarose 2%, bersama juga dimasukkan DNA ladder, kemudian proses elektroforesis dilakukan dalam alat elektroforesis dengan medium TBE 0,5x pada tegangan 100 V. Kemudian gel agarose difoto menggunakan alat gel doc 'G:BOX Chemi XRQ' dengan transiluminasi sinar ultraviolet. Didapatkan hasil berupa gambaran band yang dianalisis densitomertri menggunakan software ImageJ. Data yang diperoleh diuji normalitas dengan uji Saphiro-Wilk untuk mengetahui distribusi data, kemudian dilakukan uji one-Way ANOVA dengan post-hoc LSD. Nilai signifikansi ditentukan jika $p \leq 0,05$. Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dari komisi etik FK-KMK Universitas Gadjah Mada dengan nomor KE/FK/1117/EC/2020.

HASIL



Gambar 1. Ekspresi mRNA IL-6 lobus frotalis. Terdapat perbedaan signifikan antara kelompok kontrol dengan DM1,5 ($p=0.010$); kontrol dengan DM2 ($p=0.007$); Perbedaan signifikan juga pada kelompok DM2 dengan CGA2 ($p=0.028$). * : berbeda signifikan dengan kontrol; #: berbeda signifikan dengan DM2.



Gambar 2. Ekspresi mRNA CD86. Terdapat perbedaan signifikan antara kelompok kontrol dengan DM1,5 ($p=0.000$); kontrol dengan DM2 ($p=0.000$); Perbedaan signifikan juga pada kelompok DM2 dengan CGA2 ($p=0.000$); kelompok DM2 dengan CGA3 ($p=0.000$). * : berbeda signifikan dengan kontrol; #: berbeda signifikan dengan DM2.

Ekspresi mRNA IL-6 lobus frontalis

Data dari semua kelompok terlebih dahulu di uji normalitas dengan uji Saphiro-wilk dengan hasil keenam grup memiliki distribusi normal ($p \geq 0.05$). kemudian dilakukan uji one-way ANOVA

dengan hasil $p=0.013$ menunjukkan bahwa ada minimal satu kelompok yang memiliki perbedaan yang signifikan secara statistik diantara seluruh kelompok. Kemudian dari hasil uji post-hoc LSD terdapat perbedaan signifikan antara kelompok kontrol dengan DM1,5 ($p=0.010$); kontrol dengan DM2 ($p=0.001$); kelompok kontrol dengan CGA1 ($p=0.007$); kelompok kontrol dengan CGA2 ($p=0.0106$); dan kelompok kontrol dengan CGA3 ($p=0.008$). Perbedaan signifikan juga pada kelompok DM2 dengan CGA2 ($p=0.028$).

Ekspresi mRNA CD86 lobus frontalis

Data dari semua kelompok terlebih dahulu di uji normalitas dengan uji Saphiro-wilk dengan hasil keenam grup memiliki distribusi normal ($p \geq 0.05$). kemudian dilakukan uji one-way ANOVA dengan hasil terdapat paling tidak 1 grup yang berbeda signifikan secara statistik dengan kelompok lainnya ($p=0.000$). Pada uji post-hoc LSD didapatkan hasil perbedaan signifikan secara statistik antara kelompok kontrol dengan DM1,5 ($p=0.000$); kontrol dengan DM2 ($p=0.000$); kelompok kontrol dengan CGA1 ($p=0.000$); kelompok kontrol dengan CGA2 ($p=0.020$); dan kelompok kontrol dengan CGA3 ($p=0.039$). Perbedaan juga didapatkan antara kelompok DM2 berbeda signifikan dengan kelompok CGA2 ($p=0.000$) dan kelompok CGA3 ($p=0.000$)

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh pemberian Asam Klorogenat (CGA) pada aktivasi neuroinflamasi M1 pada tikus yang diinduksi DM dengan menggunakan streptozocin. Pada DM, hiperglikemia akan mengaktifkan jalur proinflamatorik sehingga menyebabkan neuroinflamasi (Sandireddy et al., 2014). Penelitian ini memfokuskan pada aktivasi neuroinflamasi M1 dengan analisis transkriptomik, yaitu melihat ekspresi mRNA gen IL-6 (sitokin penanda mikroglia M1) dan CD86 (penanda fenotip M1 pada membran sel). Pada hasil ekspresi mRNA IL-6 maupun CD86 didapatkan lebih tinggi signifikan secara statistik pada kedua kelompok DM1,5 dan DM2 yang menunjukkan model DM berhasil menunjukkan adanya neuroinflamasi.

Neuroinflamasi pada DM terjadi akibat hiperglikemia telah mengaktifkan beberapa jalur inflamasi. Salah satu jalur pensinyalan terpenting untuk memodulasi imunitas bawaan dan adaptif pada neuroinflamasi adalah jalur JAK / STAT. Tiga komponen utamanya adalah JAK, STAT, dan reseptor. Untuk mengontrol ekspresi gen tertentu, STAT mengalami fosforilasi, dimerisasi, dan translokasi nuklir setelah JAK berikatan dengan ligannya. Sistem JAK / STAT adalah salah satu jalur signifikan yang mengatur berbagai sinyal untuk menjaga homeostasis dalam keadaan inflamasi yang memungkinkan produksi sitokin dan Interferon (IFN) (Isik et al., 2023). Ketika fosforilasi jalur JAK / STAT diblokir, fenotip mikroglial beralih dari keadaan pro-inflamasi ke keadaan anti-inflamasi. Di sisi lain, ada juga penelitian yang menunjukkan bahwa aktivitas STAT1 sangat penting untuk polarisasi makrofag M1. Aktivasi jalur JAK2/STAT1 meningkatkan polarisasi makrofag ke dalam fenotip M1 karena meningkatkan produksi gen yang mengkode IL-1, kemokin motif CXC 10 (CXCL10), dan TNF (Laurence & Natoli., 2011; Varinou et al., 2003). Aktivasi JAK2 / STAT3 menginduksi mikroglia untuk terpolarisasi menjadi fenotip M1, yang akibatnya menyebabkan kerusakan inflamasi pada hippocampus (Fan et al., 2022). Banyak bukti menunjukkan bahwa jalur JAK / STAT berperan dalam neuroinflamasi dengan memodifikasi polarisasi mikroglial dengan peningkatan kadar IFN dan IL-6, dua aktivator jalur JAK / STAT yang paling kuat (Chen et al., 2008; Mount et al., 2007; Xin et al., 2020).

Selain keterlibatannya pada jalur JAK / STAT, ekspresi IL-6 dapat meningkat pada pengaktifan salah satu jalur inflamasi yaitu jalur Rho/ROCK (Isik et al., 2023). Rho yang termasuk dalam superfamili Ras GTPase kecil, adalah anggota penting dari GTPase. Protein downstream dari Rho GTPase kecil, Rhokinase (ROCK), terbukti terlibat dalam berbagai proses fisiologis dalam sel,

seperti gerakan, morfologi, polaritas, kontraksi, ekspresi gen, dan pembelahan sel (Amano et al., 2010). Disregulasi dapat menjadi faktor penyebab dalam patofisiologi berbagai penyakit neurodegeneratif (Stankiewicz & Linsenman, 2014). Jalur pensinyalan Rho / ROCK juga merupakan komponen penting dari proses peradangan (Wang et al., 2015). Jalur ROCK memiliki pengaruh regulasi potensial pada fenotip mikroglia. Mikroglia dapat beralih dari keadaan M1 menjadi M2 sebagai respons terhadap inhibitor ROCK, sehingga mengurangi molekul pro-inflamasi, termasuk IL-6 (Chen et al., 2017). Pada penelitian ini, ekspresi mRNA IL-6 juga menurun pada pemberian CGA dengan dosis 25mg/KgBB menunjukkan adanya keterlibatan CGA pada jalur JAK/STAT dan/atau jalur Rho/ROCK penyebab neuroinflamasi.

Pada penelitian ini, ekspresi mRNA CD86 juga lebih rendah pada grup dengan pemberian CGA dengan dosis 25 mg/KgBB dan 50 mg/kgBB. CD86 merupakan marker pada permukaan sel mikroglia yang telah aktif mengalami polarisasi menjadi M1 mikroglia. Polarisasi mikroglia menjadi M1 selain melalui kedua jalur diatas, polarisasi M1 juga dapat teraktivasi dengan inisiasi jalur pensinyalan oleh IFN γ /1, fosforilasi STAT1 dan faktor pengatur interferon, dan translokasi ke nukleus melalui JAK1/2. Agregat dari α -syn dilepaskan ke ruang ekstraseluler mengikat TLR2 mengikuti mekanisme kerja TLR2s, memicu aktivasi NF- κ B dan upregulation NF- κ B-dependent NLRP3 berikutnya dan produksi sitokin proinflamasi. Aktivasi NF- κ B melalui jalur IFN dan JAK/STAT, memicu munculnya fenotip M1 mikroglia yang salah satunya berupa penanda permukaan sel berupa CD86, CD16/32, dan MHC II (Isik et al., 2023).

Pada penelitian lain, CGA telah menunjukkan beragam efek neuroprotektif pada berbagai kondisi neuropatologis yang dapat diberikan melalui penghambatan inflamasi saraf, pengurangan produksi ROS, pencegahan oksidasi, dan penekanan apoptosis neuronal (Gul et al., 2016; Mira et al., 2015; Wang et al., 2017; Yao et al., 2019). CGA dapat mengurangi peradangan saraf yang diinduksi mikroglia yang terlalu aktif di korteks. CGA menekan sekresi TNF- α dan generasi NO dalam mikroglia primer yang dirangsang LPS, meningkatkan kelangsungan hidup neuron dopaminergic (shen et al., 2012). CGA dan metabolitnya dianggap mampu melewati sawar darah-otak (*Blood Brain Barrier*) dan mengeksekusi dampaknya pada sistem saraf (Camfield et al, 2013; Lee et al,2012; Cropley et al, 2012; Ohnishi et al, 2006). Pada penelitian ini, kelompok dengan pemberian dosis CGA 25mg/KgBB memiliki ekspresi mRNA IL-6 dan CD86 lobus frontal yang signifikan lebih rendah dari pada grup DM2. Hal ini menunjukkan pada dosis tersebut CGA mampu menurunkan aktifitas neuroinflamasi dengan jalur M1 mikroglia. Chlorogenic Acid (CGA) dapat berikatan dengan domain PH dari AKT, suatu protein kinase, membuat AKT terfosforilasi menjadi p-AKT. AKT yang aktif kemudian menyebabkan inaktivasi GSK-3 β (Gao et al., 2018). Glycogen syntase kinase-3 (GSK-3) merupakan suatu protein kinase yang banyak ditemukan pada otak, GSK-3 β berkontribusi pada fosforilasi abnormal dari protein terikat mikrotubulus yang dihubungkan dengan kejadian terjadinya penyakit Alzheimer (Kaidanovich-Beilin & Woodgett, 2011; Beurel et al., 2015). GSK-3 memiliki dua isoform yaitu GSK-3 α dan GSK-3 β . GSK-3 α ditemukan terutama pada hipokampus, korteks, striatum, dan otak kecil. Sedangkan GSK-3 β ditemukan pada seluruh bagian otak (Kaidanovich-Beilin & Woodgett, 2011). GSK-3 β meregulasi inflamasi pada neuron dengan cara NF- κ B menjaga interitas dari TLR, NEMO, serta menghambat akumulasi CREB (Souder & Anderson, 2019). Penurunan aktivitas pada GSK-3 β karena CGA ini selanjutnya akan menurunkan aktivitas neuroinflamasi yang menghambat aktivasi M1 mikroglia yang ditandai dengan ekspresi mRNA IL-6 dan CD86 lobus frontal yang lebih rendah secara signifikan dari pada kelompok DM 2 bulan. Pada ketiga dosis CGA yang diberikan, dosis 25mg/kgBB memiliki hasil aktifitas antiinflamasi pada M1 yang paling baik dibandingkan dosis 12,5 dan 50mg/kgBB.

KESIMPULAN

Ekspresi mRNA penanda jaras proinflamatorik M1 pada neuroinflamasi lobus frontal akibat DM lebih rendah setelah pemberian CGA dengan dosis 25mg/KgBB.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami ucapkan terimakasih kepada Tiara dan Faizah atas bantuannya dalam teknis laboratorium. Penelitian ini merupakan penelitian lanjutan dan didanai oleh Dana Riset Afiriasi Fakultas Kedokteran IPB University tahun 2023 dengan nomor kontrak 41084/IT3.D10/PT.01.03/P/B/2023

DAFTAR PUSTAKA

- Amano, M., Nakayama, M., & Kaibuchi, K. (2010). Rho-Kinase/ROCK: A Key Regulator of the Cytoskeleton and Cell Polarity. *Cytoskeleton*, 67, 545–554. doi: 10.1002/cm.20472
- Beurel, E., Grieco, S.F., & Jope, R.S. (2015). Diseases. *Pharmacol Ther.* Author April: 114–131. doi:10.1017/S0003598X00113821
- Camfield, D.A., Silber, B.Y., Scholey, A.B., Nolidin, K., Goh, A., & Stough, C. (2013). A randomised placebo-controlled trial to differentiate the acute cognitive and mood effects of chlorogenic acid from decaffeinated coffee. *PLoS ONE*, 8, Article e82897. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082897>
- Cropley, V., Croft, R., Silber, B., Neale, C., Scholey, A., Stough, C., & Schmitt, J. (2012). Does coffee enriched with chlorogenic acids improve mood and cognition after acute administration in healthy elderly: A pilot study. *Psychopharmacology*, 219, 737–749. Doi: 10.1007/s00213-011-2395-0
- Chen, H., O'Reilly, E.J., & Schwarzschild, M.A. (2008). Ascherio, A. Peripheral Inflammatory Biomarkers and Risk of Parkinson's Disease. *Am. J. Epidemiol.*, 167, 90–95. 10.1093/aje/kwm260
- Chen, J., Sun, Z., Jin, M., Tu, Y., Wang, S., Yang, X., Chen, Q., Zhang, X., Han, Y., & Pi, R. (2017). Inhibition of AGEs/RAGE/Rho/ROCK Pathway Suppresses Non-Specific Neuroinflammation by Regulating BV2 Microglial M1/M2 Polarization through the NF-KB Pathway. *J. Neuroimmunol.*, 305, 108–114. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2017.02.010
- Fan, Z., Zhang, W., Cao, Q., Zou, L., Fan, X., Qi, C., Yan, Y., Song, B., & Wu, B. (2022). JAK2/STAT3 Pathway Regulates Microglia Polarization Involved in Hippocampal Inflammatory Damage Due to Acute Paraquat Exposure. *Ecotoxicol. Env. Saf.*, 234, 113372. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113372>
- Gao, J., He, X., Ma, Y., Zhao, X., Hou, X., Hao, E., Deng, J., & Bai, G. (2018). Chlorogenic acid targeting of the AKT PH domain activates AKT/GSK3 β /FOXO1 signaling and improves glucose metabolism. *Nutrients* 10. doi:10.3390/nu10101366
- Giugliano, D., Ceriello, A., & Esposito, K. (2008). Glucose metabolism and hyperglycemia. *Am. J. Clin. Nutr.* 87: 217–222. doi:10.1093/ajcn/87.1.217s
- Glovaci, D., Fan, W., & Wong, N.D. (2019). Epidemiology of Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease. *Curr. Cardiol. Rep.* 21: 1–8. doi:10.1007/s11886-019-1107-y
- Gonthier, M.P., Verny, M.A., Besson, C., Rémésy, C., & Scalbert, A. (2003). Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. *Am. Soc. Nutr. Sci.* 133: 1853–1859. doi:10.1093/jn/133.6.1853

- Gul, Z., Demircan, C., Bagdas, D., & Buyukuysal, R.L. (2016). Protective Effects of Chlorogenic Acid and its Metabolites on Hydrogen Peroxide-Induced Alterations in Rat Brain Slices: A Comparative Study with Resveratrol. *Neurochem. Res.*, 41, 2075–2085. DOI:10.1007/s11064-016-1919-8
- Heitman, E., & Ingram, D.K. (2014). Cognitive and neuroprotective effects of chlorogenic acid. *Nutr. Neurosci.* 1–6. DOI: 10.1179/1476830514Y.0000000146
- Isik, S., Yeman, KB., Akbayir, R., Seyhali, R., Arpaci, T. (2023). Microglia Mediated Neuroinflammation in Parkinson's Disease. *Cells.*, 5;12(7):1012. doi: 10.3390/cells12071012.
- Kaidanovich-Beilin, O., & Woodgett, J.R. (2011). GSK-3: Functional Insights from Cell Biology and Animal Models. *Front. Mol. Neurosci.* 4: 1–25. doi:10.3389/fnmol.2011.00040
- Kwon, S., Lee, H., Kim, J., Hong, S., Kim, H., Jo, T., et al. (2010). Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 649: 210–217. doi:10.1016/j.ejphar.2010.09.001
- Lee, K., Lee, J.S., Jang, H.J., Kim, S.M., Chang, M.S., Park, S.H., Kim, K.S., Bae, J., Park, J.W., Lee, B., et al. (2012). Chlorogenic acid ameliorates brain damage and edema by inhibiting matrix metalloproteinase-2 and 9 in a rat model of focal cerebral ischemia. *Eur. J. Pharmacol.*, 689, 89–95. DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.05.028
- Lawrence, T., & Natoli, G. (2011). Transcriptional Regulation of Macrophage Polarization: Enabling Diversity with Identity. *Nat. Rev. Immunol.*, 11, 750–761. DOI: 10.1038/nri3088
- Mira, A., Yamashita, S., Katakura, Y., & Shimizu, K. (2015). In vitro neuroprotective activities of compounds from *Angelica shikokiana* Makino. *Molecules*, 20, 4813–4832. <https://doi.org/10.3390/molecules20034813>
- Moheet, A., Mangia, S., & Seaquist, E.R. (2015). Impact of diabetes on cognitive function and brain structure. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1353: 60–71. doi:10.1111/nyas.12807
- Mount, M.P., Lira, A., Grimes, D., Smith, P.D., Faucher, S., Slack, R., Anisman, H., Hayley, S., & Park, D.S. (2007). Involvement of Interferon- γ in Microglial-Mediated Loss of Dopaminergic Neurons. *J. Neurosci.*, 27, 3328. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5321-06.2007
- Naveed, M., Hejazi, V., Abbas, M., Kamboh, A.A., Khan, G.J., Shumzaid, M., et al. (2018). Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomed. Pharmacother.* 97: 67–74. doi:10.1016/j.biopha.2017.10.064
- Nguyen, V., Taine, E.G., Meng, D., Cui, T., & Tan, W. (2024). Chlorogenic Acid: A Systematic Review on the Biological Functions, Mechanistic Actions, and Therapeutic Potentials. *Nutrients*, 23;16(7):924. doi: 10.3390/nu16070924
- Ohnishi, R., Ito, H., Iguchi, A., Shinomiya, K., Kamei, C., Hatano, T., & Yoshida, T. (2006). Effects of chlorogenic acid and its metabolites on spontaneous locomotor activity in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 2560–2563. DOI: 10.1271/bbb.60243
- Piatkowska-Chmiel, I., Herbet, M., Gawronska-Grzywacz, M., Ostrowska-Lesko, M., & Dudka, J., (2021). The role of molecular and inflammatory indicators in the assessment of cognitive dysfunction in a mouse model of diabetes. *Int. J. Mol. Sci.* 22. doi:10.3390/ijms22083878
- Sandireddy, R., Yerra, V.G., Areti, A., Komirishetty, P., & Kumar, A. (2014). Neuroinflammation and oxidative stress in diabetic neuropathy: Futuristic strategies based on these targets. *Int. J. Endocrinol.* 2014. doi:10.1155/2014/674987

- Shen, W., Qi, R., Zhang, J., Wang, Z., Wang, H., Hu, C., Zhao, Y., Bie, M., Wang, Y., Fu, Y., et al. (2012). Chlorogenic acid inhibits LPS-induced microglial activation and improves survival of dopaminergic neurons. *Brain Res. Bull.*, 88, 487–494. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2012.04.010
- Souder, D.C., & Anderson, R.M. (2019). An expanding GSK3 network: implications for aging research. *GeroScience* 41: 369–382. doi:10.1007/s11357-019-00085-z
- Stankiewicz, T.R., & Linseman, D.A. (2014). Rho Family GTPases: Key Players in Neuronal Development, Neuronal Survival, and Neurodegeneration. *Front. Cell. Neurosci.*, 8, 314. DOI: 10.3389/fncel.2014.00314
- Varinou, L., Ramsauer, K., Karaghiosoff, M., Kolbe, T., Pfeffer, K., Müller, M., & Decker, T. (2003) Phosphorylation of the Stat1 Transactivation Domain Is Required for Full-Fledged IFN--Dependent Innate Immunity. *Immunity*, 19, 793–802. DOI: 10.1016/s1074-7613(03)00322-4
- Wang, X., Fan, X., Yuan, S., Jiao, W., Liu, B., Cao, J., & Jiang, W. (2017). Chlorogenic acid protects against aluminium-induced cytotoxicity through chelation and antioxidant actions in primary hippocampal neuronal cells. *Food Funct.*, 8, 2924–2934. <https://doi.org/10.1039/C7FO00659D>
- Wang, C., Song, S., Zhang, Y., Ge, Y., Fang, X., Huang, T., Du, J., & Gao, J. (2015). Inhibition of the Rho/Rho Kinase Pathway Prevents Lipopolysaccharide-Induced Hyperalgesia and the Release of TNF-and IL-1 in the Mouse Spinal Cord. *Sci. Rep.*, 5, 14553. DOI: 10.1038/srep14553
- Xin, P., Xu, X., Deng, C., Liu, S., Wang, Y., Zhou, X., Ma, H., Wei, D., & Sun, S. (2020). The Role of JAK/STAT Signaling Pathway and Its Inhibitors in Diseases. *Int. Immunopharmacol.*, 80, 106210. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.106210
- Yang, Z., & Wang, K.K.W. (2015). Glial fibrillary acidic protein: From intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends Neurosci.* 38: 364–374. doi:10.1016/j.tins.2015.04.003
- Yao, J., Peng, S., Xu, J., & Fang, J. (2019). Reversing ROS-mediated neurotoxicity by chlorogenic acid involves its direct antioxidant activity and activation of Nrf2-ARE signaling pathway. *Biofactors*, 45, 616–626. DOI: 10.1002/biof.1507