

Pengaruh Ekstrak Buah Bakau (*Rhizophora* sp) terhadap Ekspresi *Monocyte Chemoattractant Protein-1* pada Aorta Tikus Aterosklerosis

Muhammad Yulis Hamidy^{1*}, Huriatul Masdar², Ayu Trisya Arti³

ABSTRACT

Atherosclerosis is an atheromatous plaque that protrudes into and clogs blood vessels. This study aimed to analyze the effect of *Rhizophora* sp extract on the expression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) in the early stages of atherosclerosis in rats fed an atherogenic diet. Eighteen abdominal aortic paraffin blocks of white rats were used, consisting of 3 groups: normal diet (K1), atherogenic diet (K2), and atherogenic diet and *Rhizophora* sp extract (K3). The effect of *Rhizophora* sp extract was assessed by immunohistochemical examination. MCP-1 expression was calculated in 5 fields of view, then analyzed using Photoshop Image Analysis. The results of this study indicated that administration of *Rhizophora* sp extract reduced MCP-1 expression in K3 compared to K2 (0.155 ± 0.075 vs 0.246 ± 0.097) although this result was not statistically significant. In conclusion, *Rhizophora* sp extract has the ability to inhibit MCP-1 expression in the aorta of rats fed an atherogenic diet.

Keywords: Atherosclerosis, Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), *Rhizophora* sp

Aterosklerosis adalah kerusakan pada dinding arteri yang mengenai dua lapisan membran yaitu intima dan media. Ada tiga faktor penting penyebab aterosklerosis yaitu stress oksidatif, hipertensi, dan hiperkolesterolemia.¹ Secara global sekitar 17,9 juta jiwa setiap tahun meninggal akibat penyakit kardiovaskular.² Aterosklerosis memiliki peranan pada penyakit kardiovaskular, khususnya penyakit jantung koroner (PJK), dan menjadi penyebab kematian utama di banyak negara.³

Aterosklerosis merupakan inflamasi kronis dan perjalanan penyakitnya melibatkan lipid, komponen dinding vaskular, sistem imun, serta trombus yang ditandai dengan akumulasi kolesterol, infiltrasi makrofag, proliferasi sel otot polos, akumulasi komponen jaringan ikat dan pembentukan trombus.^{4,5}

Salah satu upaya dalam menurunkan angka kematian akibat aterosklerosis adalah melalui pengembangan fitofarmaka dengan memanfaatkan

sumber daya alam yang ada. Antioksidan eksogen yang berasal dari berbagai tumbuhan dapat dimanfaatkan dalam mencegah terjadinya stres oksidatif sehingga efek yang ditimbulkannya di tingkat seluler dapat dicegah.

Bakau/*mangrove* merupakan salah satu tumbuhan bermanfaat yang berinteraksi langsung dengan kehidupan manusia khususnya masyarakat pesisir. Ekstrak dan bahan baku bakau banyak digunakan sebagai sumber makanan dan untuk tujuan pengobatan alami.⁶

Berdasarkan hasil penelitian Podungge *et al.* menunjukkan bahwa pada sediaan ekstrak E30 terdeteksi adanya flavonoid, triterpenoid dan steroid serta tanin, saponin dan kuinon yang dominan. Flavonoid merupakan salah satu senyawa bioaktif yang dapat berperan sebagai antioksidan.⁷ Salah satu buah yang kaya antioksidan dari bakau adalah *black mangrove* (*R. mucronata*).⁸

Hasil penelitian sebelumnya oleh Hamidy *et al.* menunjukkan ekstrak metanol buah bakau *Rhizophora* sp dapat mencegah pembentukan sel busa di tahap awal aterosklerosis pada tikus yang diinduksi diet aterogenik.⁹ Proses aterogenesis tergantung pada (1) ekspresi molekul adhesi leukosit (LAM), (2) sinyal kimia seperti MCP-

* Corresponding author: yulis.hamidy@gmail.com

¹ KJFD Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Riau, Pekanbaru, Riau, Indonesia

² KJFD Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Riau, Pekanbaru, Riau, Indonesia

³ Program Studi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Riau, Pekanbaru, Riau, Indonesia

1, *Interleukin 8 (IL8)*, dan *Interferon-Inducible Protein-10*.¹⁰ Protein kemoatraktan monosit 1 (MCP-1), molekul adhesi sel vaskular-1 (VCAM-1) dan molekul adhesi interseluler-1 (ICAM-1) terutama bertanggung jawab untuk kemotaksis dan adhesi monosit.¹¹

Penelitian ini meneliti bagaimana pengaruh pemberian ekstrak buah bakau *Rhizophora* sp terhadap ekspresi MCP-1 pada tahap awal aterosklerosis pada tikus yang diinduksi dengan diet aterosogenik (diet tinggi lemak).

METODE

Penelitian ini menggunakan desain rancangan acak terkontrol dengan pola *posttest-only control group design* untuk mengetahui ekspresi MCP-1 pasca pemberian ekstrak buah bakau *Rhizophora* sp pada aorta tikus yang diinduksi aterosklerosis. Ekstrak buah bakau didapatkan melalui proses maserasi bubuk buah bakau dengan menggunakan pelarut etanol. Buah bakau yang digunakan pada penelitian ini berasal dari daerah pesisir Dumai Provinsi Riau.

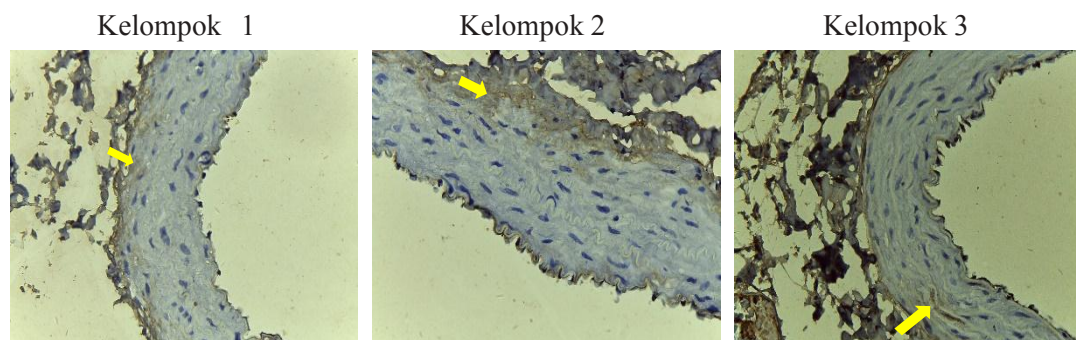
Populasi pada penelitian ini adalah 18 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar dengan usia sekitar 8-10 minggu dan bobot 180-250 gram. Tikus dibagi menjadi 3 kelompok yaitu Kelompok 1 (K1) adalah kelompok kontrol negatif yang diberi pakan pelet standar 20 gram/hari selama 3 hari, Kelompok 2 (K2) adalah kelompok kontrol positif yang diberi diet tinggi lemak 20 gram/hari selama 3 hari, dan Kelompok 3 (K3) adalah kelompok perlakuan yang diberi diet tinggi lemak 20 gram/hari dan ekstrak buah *mangrove* 500 mg/kgBB/hari selama 3 hari.

Pemeriksaan ekspresi MCP-1 dilakukan secara kuantitatif dengan menilai luas area terwarnai yang merupakan bentuk ekspresi MCP-1 pada tunika intima dan tunika media aorta abdominal tikus. Antibodi yang digunakan adalah MCP-1 *polyclonal antibody* (Bioss Antibodies Inc., Massachusetts, USA). Ekspresi MCP-1 dinilai dengan mengobservasi slide jaringan aorta tikus dalam 5 lapangan pandang berbeda menggunakan mikroskop yang dihubungkan ke komputer, kemudian dipotret dengan perbesaran 400x menggunakan aplikasi *Leica Acquired*. Daerah yang terwarnai (ekspresi MCP-1) kemudian dikalkulasikan menggunakan perangkat lunak *Photoshop Image Analysis*. Hasil kalkulasi disajikan secara kuantitatif dalam bentuk persentase dan merupakan ekspresi MCP-1 baik di tunika intima maupun tunika media. Data yang diperoleh selanjutnya dianalisis menggunakan *One Way Anova* dengan derajat kepercayaan 95%.

Penelitian ini telah lulus uji etik oleh Unit Etika Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Riau dengan Surat Keterangan Lolos Kaji Etik No.B/154/UN19.5.1.1.8/UEPKK/2022.

HASIL

Pemeriksaan imunohistokimia luas ekspresi MCP-1 pada aorta abdominal tikus secara kuantitatif dapat dilihat dari perbandingan persentase warna coklat sebagai warna acuan ekspresi MCP-1 pada 3 kelompok. Secara kualitatif dapat dilihat pada Gambar 1 berikut.



Gambar 1. Pemeriksaan imunohistokimia ekspresi MCP-1 pada aorta abdominal tikus (ditunjukkan oleh panah berwarna kuning, dengan pembesaran 400x).

Gambar di atas menunjukkan ekspresi MCP-1 pada tunika intima dan media aorta abdominal tikus putih Kelompok 1 (tikus diberi diet normal), Kelompok 2 (tikus diinduksi diet aterogenik), dan Kelompok 3 (tikus diinduksi diet aterogenik dan ekstrak buah *Rhizophora* sp). Terlihat adanya penurunan ekspresi MCP-1 yang terwarnai kecoklatan pada Kelompok 3 dibandingkan dengan Kelompok 2 yang ditunjukkan oleh panah berwarna kuning. Penilaian ekspresi ini dilakukan berdasarkan persentase luas area yang terwarnai.

Setelah dianalisis secara statistik didapatkan rerata luas ekspresi MCP-1 pada Kelompok 1, 2, dan 3 yang dapat dilihat pada Tabel 1 berikut ini.

Tabel 1. Luas ekspresi MCP-1 pada masing-masing kelompok

Kelompok		Rerata \pm SE (%)	p
K1	4	0,063 \pm 0,013	0,341
K2	6	0,246 \pm 0,097	
K3	6	0,155 \pm 0,075	

Keterangan: Nilai p bermakna jika $<0,05$

Nilai rerata luas ekspresi MCP-1 aorta tikus putih (*Rattus norvegicus*) dari yang terbesar sampai yang terkecil berturut-turut adalah pada kelompok K2, K3, dan K1.

Uji normalitas sebaran data luas ekspresi MCP-1 aorta di setiap kelompok diuji dengan menggunakan *Saphiro Wilk* dan didapatkan distribusi data yang normal ($p>0,05$). Uji homogenitas menunjukkan data ini memiliki varians yang normal ($p>0,05$). Data selanjutnya dianalisis dengan menggunakan *One Way Anova*. Setelah dilakukan uji *One Way Anova*, didapatkan hasil bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna luas ekspresi MCP-1 antar ketiga kelompok ($p>0,05$).

PEMBAHASAN

Penelitian ini menunjukkan luas ekspresi MCP-1 pada aorta tikus yang diberi ekstrak buah *Rhizophora* sp selama 3 hari setelah diinduksi dengan pemberian diet tinggi lemak. Pada penelitian ini, pemberian ekstrak buah bakau *Rhizophora* sp dengan dosis 500 mg/kgBB dapat menurunkan

ekspresi MCP-1 pada kelompok yang diinduksi dengan diet tinggi lemak walaupun secara statistik tidak berpengaruh secara signifikan. Penelitian sebelumnya oleh *Hamidy et al* menunjukkan pemberian ekstrak buah bakau *Rhizophora* sp dapat menekan proses pembentukan sel busa pada tahap awal aterosklerosis.¹²

Pada penelitian Harsa pemberian diet tinggi lemak dapat menurunkan kadar HDL, meningkatkan kadar kolesterol LDL, trigliserida, serta meningkatkan kadar kolesterol total secara bermakna pada darah tikus putih (*Rattus norvegicus*).¹³ Sejalan dengan penelitian *Ismawati et al* yang menggunakan lemak kambing 5%, asam kolat 0,2%, dan kolesterol 2% sebagai diet tinggi aterogenik serta pemberian vitamin D3 berperan dalam menginduksi terjadinya aterosklerosis pada tikus putih (*Rattus norvegicus*).¹⁴ Tingginya kadar LDL menyebabkan disfungsi endotel dan meningkatnya permeabilitas endotel sehingga LDL mudah masuk ke ruang subendotel.^{15,16} Disfungsi endotel merupakan tahap awal terjadinya aterosklerosis disertai dengan retensi *low-density lipoprotein* (LDL) dan modifikasinya pada tunika intima menjadi Ox-LDL.^{17,18} Proses inflamasi akan diperberat oleh sel busa dengan menghasilkan kemokin dan sitokin.^{15,19} Stres oksidatif mendorong sintesis sitokin pro-aterogenik (TNF- α dan interleukin IL-1 dan IL-6), molekul adhesi (VCAM-I dan ICAM-I), dan kemokin (MCP-1) melalui aktivasi NF-kB yang dimediasi oleh protein kejut panas (HSP-60).^{15,18}

MCP-1 (juga disebut sebagai CCL2) adalah kemokin yang berperan dalam transmigrasi monosit yang paling sering. MCP-1 diproduksi terutama oleh endotel/EC, sel otot polos, monosit dan makrofag intima, serta ekspresinya diregulasi setelah stimulus proinflamasi atau cedera jaringan, MCP-1 mendukung migrasi transendotel monosit yang bersirkulasi dari plasma ke intima.¹⁸

Penelitian *Hamidy et al* tentang efek ekstrak buah bakau *Rhizophora* sp terhadap ekspresi TGF- β 1 didapatkan bahwa ekstrak buah bakau dapat menghambat ekspresi TGF- β 1 pada aorta tikus yang diberi diet aterogenik.²² Hasil penelitian *Mile et al* mengenai hasil uji fitofarmaka buah bakau jenis *R. mucronata* yang berasal dari Desa Langge Kabupaten Gorontalo Utara adalah kadar abu 0,22

%; kadar protein 6,85 %; karbohidrat 30,30; % kadar lemak total 2,33 %; dan kadar air 52,38 %. Untuk senyawa bioaktif yang teridentifikasi yaitu senyawa, Saponin, Triptenoid, Tanin, Flavonoid dan steroid serta senyawa fenol hidroquinon.⁶

Terjadinya infiltrasi monosit ke subendotel memainkan peran penting pada tahap inisiasi dan perkembangan lesi aterosklerotik. MCP-126 merupakan salah satu faktor yang berperan penting dalam rekrutmen monosit. MCP-1 berperan pada tahap inisiasi aterosklerosis dan dapat menjadi target potensial untuk terapi aterosklerotik.²⁰ Kemampuan flavonoid yaitu menghambat oksidasi lipid dan sebagai penangkap radikal bebas.^{22,23}

Penelitian yang dilakukan Hamidy *et al* menunjukkan bahwa andrographolide menghambat ekspresi MCP-1 pada tahap inisiasi aterosklerosis pada tikus yang diinduksi diet aterogenik. Andrographolide merupakan salah satu bahan aktif utama yang dikandung oleh *Andrographis paniculata*. Zat ini merupakan antioksidan handal yang dapat menangkal radikal bebas. Pada penelitian ini andrographolide dapat mengurangi pembentukan sel busa pada tahap awal aterosklerosis.^{24,25}

KESIMPULAN

Setelah dilakukan penelitian mengenai efek pemberian ekstrak buah bakau *Rhizophora sp* terhadap luas area ekspresi MCP-1 tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar, didapatkan kesimpulan bahwa ekstrak buah bakau *Rhizophora sp* dapat menghambat ekspresi MCP-1 yang ditandai dengan menurunnya luas area ekspresi MCP-1 pada aorta abdominal tikus putih yang diinduksi diet aterogenik.

DAFTAR PUSTAKA

1. Meidayanti D. Manfaat likopen dalam tomat sebagai pencegahan terhadap timbulnya aterosklerosis. *J Med Hutama*. 2021;02(03):906–10.
2. World Health Organisation. Cardiovascular diseases [Internet]. [cited 2022 Jul 1]. Available from: https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1
3. Prameswari NP. Pemanfaatan senyawa antiaterogenik jamur tiram putih (*Pleurotus spp*) dalam pencegahan aterosklerosis. *J ilmu mahasiswa ked. Indonesia*. Mei-Oktober 2019; 7(2) : 61.
4. Hanna Nurjanah, Budi Setiawan KR. Indonesian Journal of Human Nutrition. *Indones J Hum Nutr* [Internet]. 2020;7(2):139–52.
5. Callista O, Handayani D, Tritisari KP. Pengaruh pemberian tepung daun katuk terhadap penebalan dinding aorta tikus wistar. *Indonesian Journal of Human Nutrition*, Desember 2015, 2(2) : 85 – 90.
6. Mile L, Nursyam H, Setijawati D, Sulistiyati TD. Studi fitokimia buah mangrove (*rhizophora mucronata*) di desa langge kabupaten gorontalo utara. *Jambura Fish Processing Journal*. 2021; 3(1): 1.
7. Podungge F, Purwaningsih S, Nurhayati T. 2015. The Characteristic of black bakau fruit as extract of antioxidant source. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 18 (2): 140–149.
8. Purwaningsih S, Salamah E, Yudha A, Sukarno P, Deskawati E. 2013. Aktivitas antioksidan dari buah mangrove (*Rhizophora mucronata Lamk.*) pada suhu yang berbeda. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 16: (3)
9. Hamidy MY, Masdar H, Darmawi D. Effect of mangrove (*rhizophora sp*) fruit extract on foem cell formation at the initiation stage of atherosclerosis. *Biomed Pharmacol J* 2020; 13(1).
10. Soehnlein O. Multiple roles for neutrophils in atherosclerosis. *Circ Res* 2012;110:875-88.
11. Aprotosoai AC, Costache AD, Costache II. Therapeutic strategies and chemoprevention of atherosclerosis: what do we know and where do we go? *Pharm* 2022, Vol 14, Page 722 [Internet]. 2022 Mar 28 [cited 2022 Jul 2];14(4):722.
12. Hamidy MY, Masdar H, Darmawi D. Effect of mangrove (*rhizophora sp*) fruit extract on foem cell formation at the initiation stage of atherosclerosis. *Biomed Pharmacol J* 2020; 13(1).
13. Harsa IMS. Efek pemberian diet tinggi lemak terhadap profil lemak darah tikus putih

- (*Rattus norvegicus*). Univ Wijaya Kusuma. 2014;31(1):21–8.
14. Ismawati, Oenzil F, Yanwirasti, Yerizel E. Changes in expression of proteasome in rats at different stages of atherosclerosis. *Anat Cell Biol*. 2016;49(2):99–106.
 15. Alfariasi HAH, Mohamed ZBH, Ibrahim M Bin. Basic pathogenic mechanisms of atherosclerosis. *Egypt J Basic Appl Sci [Internet]*. 2020;7(1):116–25.
 16. Zhang ZK, Li J, Yan DX, Leung WN, Zhang BT. Icaritin inhibits collagen degradation-related factors and facilitates collagen accumulation in atherosclerotic lesions: A potential action for plaque stabilization. *Int J Mol Sci*. 2016;17(2):1–16.
 17. Bergheanu, SC. Bodde, MC. Jukema, JW. Patofisiologi dan pengobatan aterosklerosis. *Neth Heart J*. 2017 Apr; 25(4): 231–242.
 18. Jebari-Benslaiman S, Galicia-García U, Larrea-Sebal A, Olaetxea JR, Alloza I, Vandenbroeck K, et al. Pathophysiology of Atherosclerosis. *Int J Mol Sci*. 2022;23(6):1–38.
 19. Marchio P, Guerra-Ojeda S, Vila JM, Aldasoro M, Victor VM, Mauricio MD. Targeting early atherosclerosis: A focus on oxidative stress and inflammation. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019(Ldl):1–32.
 20. Hamidy MY, Masdar H, Winarto W. Mangrove (*Rhizophora* sp.) fruit extract inhibits tumor growth factor (TGF)- β 1 expression in high cholesterol diet-fed rats. *J Farm Galen (Galenika J Pharmacy)*. 2021;7(3):213–20.
 21. Hamidy MY, Oenzil F, Yanwirasti, Aldi Y. Effect of andrographolide on monocyte chemoattractant protein-1 expression at the initiation stage of atherosclerosis in atherogenic diet-fed rats. *Biomed Pharmacol J*. 2019;12(3):1167–73.
 22. Banjarnahor, S. D. S., Artanti, N. Antioxidant properties of flavonoids. *Medical Journal of Indonesia*. 2014; 23(4), 239–244.
 23. Trembl J, Šmejkal K. Flavonoids as Potent Scavengers of Hydroxyl Radicals. *Compr Rev Food Sci Food Saf [Internet]*. 2016 Jul 1 [cited 2022 Nov 8];15(4):720–38.
 24. Hamidy MY, Oenzil F, Yanwirasti, Aldi Y. Effect of andrographolide on monocyte chemoattractant protein-1 expression at the initiation stage of atherosclerosis in atherogenic diet-fed rats. *Biomed Pharmacol J*. 2019;12(3):1167–73.
 25. Maulita SD, Santosa PE, Suharyati S, Hartono M, Tantalo S. The profile of avian influenza and newcastle disease antibody titers on rooster by giving sambiloto extract treatment. 2022 [cited 2022 Nov 9];6(4):360–7