

## ARTIKEL PENELITIAN

# Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Pohon Andalas (*Morus macraura* Miq.) Terhadap Ekspresi Gen ET-1 Pada Tikus Model Aterosklerosis

Dio Kurniawan<sup>1</sup>, Intan Putri Syamtoni<sup>2</sup>, Tio Firmansyah<sup>3</sup>, Siti Aisyah<sup>1</sup>, Hirowati Ali<sup>4\*</sup>

1. Jurusan Ilmu Biomedis, Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas, Kampus Unand Limau Manis Pauh Padang, Sumatera Barat 25162, Indonesia; 2. Jurusan Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas, Kampus Unand Limau Manis Pauh Padang, Sumatera Barat 25162, Indonesia; 3. Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas, Kampus Unand Limau Manis Pauh Padang, Sumatera Barat 25162, Indonesia; 4. Bagian Biokimia, Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas, Kampus Unand Limau Manis Pauh Padang, Sumatera Barat 25162, Indonesia

**Korespondensi:** Hirowati Ali, email: [hirowatiali@med.unand.ac.id](mailto:hirowatiali@med.unand.ac.id). HP: 081276163526

### Abstrak

**Tujuan:** mengetahui respon antiinflamasi dari pemberian ekstrak buah pohon andalas (*Morus macroura* Miq.) terhadap gen ET-1 dan penebalan tunika intima tikus model aterosklerosis. **Metode:** uji eksperimental. Hewan coba dibagi dalam 6 kelompok, dengan 3 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan. Kelompok kontrol negatif tanpa perlakuan, kelompok kontrol positif dengan ligasi arteri karotis dan diet tinggi lemak, kelompok kontrol K hanya dengan ligasi arteri. Untuk semua kelompok perlakuan dilakukan ligasi arteri karotis, pemberian diet tinggi lemak, dan pemberian ekstrak buah pohon andalas 1 ml dengan dosis yang berbeda (100mg/kgBB, 300 mg/kgBB, dan 500 mg/kgBB). Pemberian diet tinggi lemak dilakukan selama 1 minggu. Ekstrak buah andalas diberikan secara oral selama 15 hari. Analisis kuantitatif kadar gen ET-1 dilakukan dengan menggunakan qPCR sedangkan untuk mengetahui respon terhadap penumpukan plak aterosklerosis dilakukan dengan cara pemeriksaan histopatologi. **Hasil:** Adanya hubungan yang signifikan antara pemberian ekstrak buah pohon andalas terhadap ekspresi gen ET-1 dengan nilai 0,02 ( $P < 0,05$ ) dan adanya pengaruh terhadap penebalan tunika intima tikus aterosklerosis yang dibuktikan dengan gambaran histologi arteri karotis tikus yang menunjukkan pengurangan plak aterosklerosis. **Kesimpulan:** pemberian ekstrak buah pohon andalas dengan dosis 300mg/kgBB berpengaruh paling baik terhadap ekspresi gen ET-1 dan penebalan tunika intima tikus yang diinduksi aterosklerosis.

**Kata kunci:** Antiinflamasi; Aterosklerosis; Gen ET-1; Tunika Intima; *Morus macroura* Miq

### Abstract

**Objective:** To determine the anti-inflammatory response of the extract of the fruit of the Andalas tree (*Morus macroura* Miq.) to the ET-1 gene and the thickening of the tunica intima of atherosclerotic rat model. **Method:** experimental test. Experimental animals were divided into 6 groups, with 3 control groups and 3 treatment groups. Negative control group without treatment, positive control group with carotid artery ligation and high fat diet, control group K only with arterial ligation. For all treatment groups, carotid artery ligation, high-fat diet, and 1 ml of Andalas tree fruit extract were administered at different doses (100mg/kgBW, 300 mg/kgBW, and 500 mg/kgBW). The high-fat diet was given for 1 week. Andalas fruit extract was given orally for 15 days. Quantitative analysis of ET-1 gene levels

was performed using qPCR, while to determine the response to atherosclerotic plaque buildup, histopathological examination was performed. **Results:** There was a significant relationship between the administration of Andalus tree fruit extract on the expression of the ET-1 gene with a value of 0.02 ( $P < 0.05$ ) and the effect on the thickening of the intima tunica of atherosclerosis rats as evidenced by the histology of the carotid arteries of rats which showed a reduction atherosclerotic plaque. **Conclusion:** administration of Andalus tree fruit extract at a dose of 300mg/kgBW had the best effect on ET-1 gene expression and atherosclerosis-induced tunica intima thickening of mice.

**Keywords:** Anti-inflammatory; Atherosclerosis; ET-1 gene; Tunica Intima; *Morus macroura* Miq

## PENDAHULUAN

Penyakit kardiovaskular masih menjadi penyakit tidak menular nomor satu penyebab kematian di dunia. Diperkirakan pada tahun 2019 sebanyak 17,9 juta orang di dunia meninggal diakibatkan penyakit kardiovaskular yang mencakup diantaranya serangan jantung dan *stroke*. Dari data yang diambil per tahun 2021 dinyatakan bahwa penyakit kardiovaskular masih sangat umum terjadi di negara-negara berkembang salah satunya di negara Indonesia<sup>1</sup>. Berdasarkan Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) serta diagnosis dokter di Indonesia, prevalensi penyakit jantung pada tahun 2018 mencapai angka 1,5% dimana, 15 dari 1000 individu atau sekitar 2.784.064 populasi di Indonesia merupakan penderita penyakit jantung. Hal ini juga menunjukkan adanya peningkatan data dari tahun-tahun sebelumnya<sup>2</sup>.

Salah satu penyakit kardiovaskular yang paling sering terjadi adalah sindrom koroner akut. Penyakit koroner akut ini disebabkan oleh penurunan aliran darah menuju jantung secara mendadak. Sindrom koroner akut menjadi penyebab kematian tertinggi di dunia yang tercatat mencapai 7,4 juta jiwa dan diprediksi akan terus meningkat hingga angka 23,3 juta angka kematian di tahun 2030<sup>3</sup>.

Penyebab terbanyak dari penyakit sindrom koroner akut salah satunya ialah aterosklerosis yang ditandai dengan pembentukan plak aterosklerotik akibat disfungsi endotel yang menyebabkan terjadinya fisura, pendarahan, dan trombosis<sup>4</sup>. Akibat terjadinya disfungsi

endotel kemudian akan mengaktifkan *Nuclear Factor KappaB* (NF- $\kappa$ B) yang memicu proses transkripsi gen proinflamasi yang mendukung pertumbuhan plak aterosklerosis<sup>5</sup>. Keadaan tersebut mengakibatkan gangguan keseimbangan kebutuhan dan suplai oksigen sehingga menimbulkan iskemia dan infark miokard<sup>6</sup>. Mekanisme dasar pemegang peran penting dari patogenesis aterosklerosis ditentukan oleh beberapa faktor di antaranya peradangan, oksidasi dan kecenderungan genetik. Perkembangan terbaru tentang patogenesis aterosklerosis diketahui bahwa metabolisme lipid yang tidak seimbang dan terintegrasi dengan respon imun yang salah dapat memicu proses inflamasi kronis di dinding pembuluh darah dan akhirnya membentuk plak aterosklerotik<sup>7</sup>.

Proses inflamasi pada aterosklerosis menyebabkan respon inflamasi dari suatu sel imun yang rusak yang akan bermigrasi ke dalam tunika intima dimana inti sel matang menjadi makrofag. Peningkatan sekresi sitokin inflamasi sebagai faktor pemicu inflamasi, dan peningkatan faktor pertumbuhan seperti interleukin 2 IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, *Tumor Necrotic Factor-Alpha* (TNF- $\alpha$ ), *Transforming Growth Factor- Beta* (TGF- $\beta$ ) dan *Endothelin 1* (ET-1), sehingga bisa mengaktifkan faktor suatu peradangan sel endotelium<sup>8</sup>.

Studi lanjutan saat ini menjelaskan bahwa gen yang paling berperan dalam perkembangan aterosklerosis adalah *Endothelin-1* (ET-1). ET-1 memiliki

kemampuan untuk meningkatkan biosintesis lipid pada jaringan endotel sehingga dapat mempercepat perkembangan plak aterosklerosis<sup>9</sup>.

Peningkatan biosintesis lipid bekerja maksimal saat ET-1 terpapar *Oxidized Low Density Lipoprotein* (OxLDL) (10). Selain itu, paparan ET-1 dengan OxLDL dapat mengaktifasi makrofag sehinggameningkatkan regulasi gen pro-inflamasi salah satunya *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS)<sup>10</sup>. iNOS dapat meregulasi sintesis *Nitric Oxide* (NO) yang apabila bereaksi dengan anion superoksida akan menyebabkan lesi jaringan endotel sehingga memperluas perkembangan plak aterosklerosis<sup>11</sup>.

Saat ini masih banyak diperlukannya pengembangan bakal obat baru untuk penyakit kardiovaskular. Pemanfaatan tumbuhan endemik khas Sumatra Barat yaitu pohon andalas (*Morus macroura* Miq.) dilirik sebagai salah satu alternatif pengobatan masa depan. Tumbuhan ini mengandung berbagai metabolit sekunder seperti turunan triterpenoid, steroid, dimerstilben dan lainnya, dengan aktivitas senyawa antitumor, antioksidan, antimikroba, dan antiinflamasi<sup>12</sup>. Potensi senyawa kimia yang ada pada tumbuhan ini dinilai cukup besar namun penelitian terkait pemanfaatan senyawa aktif tumbuhan andalas sebagai obat masih sangat minim. Oleh karena itu, dibutuhkan penelitian lanjutan untuk mengkaji manfaat dan khasiat ekstrak buah andalas sebagai antiinflamasi terutama terhadap ekspresi gen ET-1 dan respon penghambatan

progresivitas aterosklerosis pada pembuluh vaskular.

## METODE

### Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Beaker glass, sonde oral, alat ligasi arteri, mikropipet, pipet tetes, microtube dan *real-time* PCR (qPCR). Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Tikus jantan galur wistar, aquades, larutan mix PCR (sintesis cDNA, *Sybr green* dan primer GAPDH serta ET-1), anestesi, ekstrak buah pohon andalas (*M. macroura* Miq), diet standar mencit dan diet tinggi lemak tikus.

### Persiapan pembuatan ekstrak Buah Pohon Andalus

Buah Pohon Andalus (*Morus macroura* Miq.) diambil dengan karakteristik buah yang sudah matang. Selanjutnya, diambil sebanyak 2 kilogram buah dan dioven pada suhu 50°C. Hasil setelah pengeringan di oven didapatkan 200gram simplisia kering. Simplisia kering lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan pelarut etanol 90% sampai konsentrasinya 500ml. Maserasi dilakukan selama 3 hari dan dilanjutkan dengan proses penyaringan dengan kertas saring sehingga didapatkan crude ekstrak sebagai larutan stok. Setelah itu dievaporasi dengan rotary evaporator selama 1 hari. Hasil akhir didapatkan ekstrak buah andalas sebanyak 10 ml.

### Model Tikus Aterosklerosis

Tikus jantan galur wistar berumur 2-3 bulan sehat spesifik ditempatkan di Laboratorium Biomedik Universitas

Andalas pada suhu ruang 25°C dan kelembaban ruang standar. Hewan coba tikus 24 ekor dikelompokkan menjadi 6 kelompok, dengan 3 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan Ligasi arteri dilakukan dengan membedah tikus pada arteri karotis leher, lalu dilakukan ligasi arteri menggunakan benang nomor 5-0 untuk memicu respon aterosklerosis. Selain itu, respon aterosklerosis dipicu juga dengan pemberian diet tinggi lemak menggunakan campuran lemak babi 300 gram, kuning telur bebek 200 gram, aquades 100 ml dan *Carboxymethyl Cellulose* (CMC) 0,5% sebanyak 1 ml<sup>13</sup>. Penentuan besar sampel dalam penelitian ini berdasar kepada rumus Frederer (1977).

#### **Pengambilan Arteri Karotis Tikus**

Arteri karotis yang telah dimodel menjadi aterosklerosis kemudian diambil setelah 15 hari diberi perlakuan. Pengambilan arteri ini melalui proses bedah, terlebih dahulu tikus dianestesi menggunakan dietil eter dan dieuthanasia sesuai etika penelitian pada hewan coba. Selanjutnya, dilakukan isolasi RNA pada 24 ekor tikus kelompok kontrol dan perlakuan.

#### **Penghitungan kadar ET-1 dengan qPCR**

Isolasi RNA arteri karotis tikus menggunakan reagen TRIzol. Setelah itu, isolasi RNA disintesis membentuk cDNA menggunakan kit. Sintesis cDNA total dikerjakan dalam suhu 52°C selama 50 menit dengan protokol kerja sesuai dengan manual kit. Setelah dilakukan sintesis cDNA, sampel dianalisa dengan qPCR

menggunakan primer reverse dan forward gen ET-1 sebagai berikut: 5'-CCTGGACATCATCTGGGTC-3', 5'-TGTGGCCTTATTGGGAAG-3'.

#### **Gambaran Histopatologi Arteri Karotis**

Arteri karotis yang telah diligasi lalu diambil dan difiksasi dengan formalin 10%. Setelah dilakukan fiksasi jaringan lalu direndam dalam larutan xylol dilanjutkan dengan perendaman dalam paraffin cair. Paraffin yang telah mengeras lalu dipotong setebal 4 µm menggunakan mikrotom sehingga didapatkan helaian jaringan diselimuti paraffin. Selanjutnya paraffin yang telah dipotong diletakkan di atas kaca preparat. Kemudian proses pewarnaan menggunakan pewarna hematoksilin eosin (HE). Setelah dilakukan proses perendaman, penilaian gambaran histopatologis dilakukan pada perbesaran 40x secara deskriptif dengan menilai kelainan patologis yang ditemui.

#### **Analisis Data**

Kelompok eksperimen akan dianalisis dengan uji one-way anova menggunakan SPSS. Untuk data yang diperoleh berdistribusi normal, akan dilanjutkan Tukey's HSD Post Hoc- Test. Sedangkan untuk data yang diperoleh tidak terdistribusi normal, akan dianalisis dengan uji non-parametrik (uji Kruskal Wallis) kemudian dilanjutkan dengan Uji Mann Whitney.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pengaruh Ekstrak Buah Pohon Andalus terhadap Ekspresi Gen ET-1

Berdasarkan riset yang telah dilakukan, didapatkan hasil bahwa pemberian ekstrak buah pohon andalus berpengaruh terhadap penurunan ekspresi

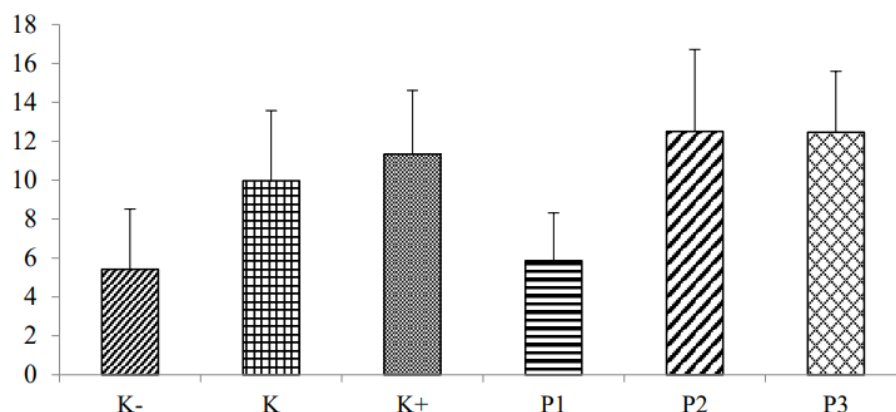
gen ET-1 sebagai pemicu aterosklerosis ( $p < 0,05$ ). Berdasarkan data yang ditampilkan pada Tabel 1 didapatkan hasil pengukuran ekspresi gen ET-1 menggunakan uji *one-way anova* dengan nilai signifikansi  $p = 0,02$ .

**Tabel 1.** Distribusi rata-rata pemberian ekstrak buah pohon andalus (*Morus macroura* Miq.) terhadap Ekspresi Gen ET-1.

Kelompok	n	Mean	SD	95% CI	P Value
K-	4	5,4	3,1	0,5-10,3	0,02
K	4	9,9	3,6	4,2-15,7	
K+	4	11,3	3,3	6,1-16,5	
P1	4	5,9	2,5	1,9-9,8	
P2	4	12,5	4,2	5,8-19,2	
P3	4	12,5	3,1	7,5-17,4	

Nilai ekspresi gen ET-1 di setiap kelompok berbeda-beda, tergantung pada dosis ekstrak buah pohon andalus yang diberikan (Gambar 2). Pada kelompok perlakuan, didapatkan nilai ekspresi gen P2 ( $Cq = 12,5$ ), P3 ( $Cq = 12,4$ ) dan P1 ( $Cq = 5,9$ ). Pada kelompok kontrol (K-, K+, dan K), nilai

ekspresi gen ET-1 kelompok K- memiliki nilai ekspresi gen paling tinggi ( $Cq = 5,4$ ) sehingga dapat disimpulkan pemberian ekstrak buah pohon andalus dengan dosis 300mg/kgBB yang diberikan pada kelompok P2 terbukti efektif dalam menurunkan ekspresi gen ET-1.



**Gambar 1.** Nilai Ekspresi Gen ET-1 di jaringan arteri karotis Tikus ( $p < 0,05$ )

Penurunan ekspresi gen ET-1 dikaitkan dengan beberapa senyawa antiinflamasi yang dimiliki oleh buah pohon andalus. Penelitian Salama *et al.*,

(2020) menemukan adanya kandungan flavonoid pada buah pohon andalus menggunakan metode kalorimetri. Flavonoid menjadi salah satu faktor

penekan ekspresi gen ET-1 melalui mekanisme penghambatan *Endothelial Nitric Oxide Synthase* (eNOS)<sup>14</sup>.

### SIMPULAN

Adanya pengaruh pemberian ekstrak buah pohon andalas terhadap penurunan ekspresi gen ET-1 tikus model aterosklerosis serta didapatkan dosis pemberian ekstrak buah pohon andalas yang optimum ialah sebesar 300mg/kgBB.

### DUKUNGAN FINANSIAL

Penelitian ini didanai oleh Direktorat Pembelajaran Dan Kemahasiswaan (Belmawa) Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, dan Teknologi (Kemendikbud-Ristek); dan Universitas Andalas.

### DAFTAR PUSTAKA

1. WHO. Cardiovascular diseases (CVDs) [Internet]. WHO. 2021 [cited 2022 Sep 10]. Available from: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
2. Kemenkes. Penyakit Jantung Koroner Didominasi Masyarakat Kota [Internet]. Kemenkes. 2021 [cited 2022 Jan 30]. Available from: <https://sehatnegeriku.kemkes.go.id/baca/umum/20210927/5638626/penyakit-jantung-koroner-didominasi-masyarakat-kota/>
3. Wahidah, Harahap RA. PJK (penyakit jantung koroner) dan SKA (sindrome koroner akut) dari prespektif epidemiologi. *J Kesehat Masy.* 2021;6(1):54–65.
4. Chang HJ, Lin FY, Lee SE, Andreini D, Bax J, Cademartiri F, et al. Coronary Atherosclerotic Precursors of Acute Coronary Syndromes. *J Am Coll Cardiol.* 2018;71(22):2511–22.
5. Saputra DPD. Molecular Docking Sianidin dan Peonidin sebagai Antiinflamasi pada Aterosklerosis Secara In Silico. *J Farm Udayana.* 2018;7(1):28.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Kami ucapkan terimakasih kepada Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset dan Teknologi Republik Indonesia yang telah mendanai penelitian ini. Selanjutnya ucapan terimakasih kami sampaikan kepada Universitas Andalas yang telah memfasilitasi penelitian ini sampai selesai dan terakhir ucapan terimakasih kami sampaikan kepada Kepala Laboratorium Biomedik Universitas Andalas, Kepala Laboratorium Herbarium Universitas Andalas dan Kepala Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.

### KONFLIK KEPENTINGAN

Tidak ada konflik kepentingan dalam riset ini.

6. Suparto, Boom CE. Infark miokard perioperatif. *J Kedokt Meditek*. 2014;20(53):12–20.
7. Alfarisi HAH, Mohamed ZBH, Ibrahim M Bin. Basic pathogenic mechanisms of atherosclerosis. *Egypt J Basic Appl Sci* [Internet]. 2020;7(1):116–25. Available from: <https://doi.org/10.1080/2314808X.2020.1769913>
8. Jackson AO, Regine MA, Subrata C, Long S. Molecular mechanisms and genetic regulation in atherosclerosis. *IJC Hear Vasc* [Internet]. 2018;21:36–44. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijcha.2018.09.006>
9. Pernow J, Shemyakin A, Böhm F. New perspectives on endothelin-1 in atherosclerosis and diabetes mellitus. *Life Sci*. 2012;91(13–14):507–16.
10. Sutton G, Pugh D, Dhaun N. Developments in the role of endothelin-1 in atherosclerosis: A potential therapeutic target? *Am J Hypertens*. 2019;32(9):813–5.
11. Gliozzi M, Scicchitano M, Bosco F, Musolino V, Carresi C, Scarano F, et al. Modulation of nitric oxide synthases by oxidized LDLs: Role in vascular inflammation and atherosclerosis development. *Int J Mol Sci*. 2019;20(13):1–16.
12. Hilda D, Violita P, Hafids A, Sofani A, Susanti T. Potential of Andalas ( *Morus macroura* Miq .) Ethanol Extract in Inhibiting the Microbial Growth. 2020;10(ICoBioSE 2019):1–4.
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. Wang T, Li Q, Bi K. Bioactive flavonoids in medicinal plants : Structure , activity and biological fate. *Asian J Pharm Sci* [Internet]. 2018;13(1):12–23. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.08.004>