

Effect of Red Dragon Fruit Extract (*Hylocereus polyrhizus*) on MDA Metabolite Products and CD36 Expression in Artery Carotid Communis Mice (*Mus musculus*) Fed a High-Fat Diet

Galuh Wiedani K.D. Larasati¹, Lailia D.K. Wardani², Djoko Legowo³

¹Fakultas Kesehatan Masyarakat, Universitas Nusa Cendana, Kota Kupang

²Laboratorium Anatomi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

³Laboratorium Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya

*Corresponding author: wiedanigaluh@gmail.com

ABSTRACT

Red Dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) has the potential for the prevention of diseases associated with inflammatory and oxidative processes such as cardiovascular diseases. This is due to the presence of their antioxidant compounds including phenols, flavonoids, tocopherol, ascorbic acid, thiamin, niacin, riboflavin, minerals, betacyanin, β -carotene, and many more. Antioxidant compounds can prevent the atherogenesis process by reducing MDA (malondyaldehyde) metabolite products and CD36 expression in artery carotid communis. MDA metabolite products are indicators of lipid peroxidation, while CD36 expression is a scavenger receptor which responsible for the retention and absorption of LDL-Ox in macrophages and endothelial cells. This study aimed to prove the effect of red dragon fruit extract in reducing MDA metabolite products and CD36 expression in artery carotid communis of mice fed a high-fat diet. This research was in vivo experimental study with a randomized post test only control group design. This research used 40 male mice which were divided into five groups, namely negative control K0 (without high fat diet and extract), positive control K1 (high fat diet without extract), P1 (5mg extract/mice/day), P2 (extract 10mg/mice/day), P3 (extract 20mg/mice/day). A high fat diet was given for 56 days. Red dragon fruit extract was given for 28 days. At the end of the study, all mice were euthanized and their artery carotid communis were collected for immunohistochemistry staining. MDA and CD36 expression measurements were carried out using the Immune Reactive Score (IRS). The results showed that red dragon fruit extract had the ability to reduce MDA and CD36 expression in mice. It can be concluded that red dragon fruit extract had the poten

Keywords: Red Dragun Fruit, MDA, CD36, artery carotid communis, immunohistochemistry

PENDAHULUAN

Penyakit kardiovaskular (CVD) menyebabkan kematian hingga 32% dari seluruh kematian tahunan di dunia. Sebagian besar kasus CVD disebabkan oleh aterosklerosis (Batty *et al.* 2022).

Aterosklerosis merupakan kondisi radang arteri kronis progresif yang ditandai dengan penebalan dan pengerasan arteri secara bertahap yang pada akhirnya akan menyebabkan penurunan diameter lumen dan berpotensi terjadinya iskemia setelah pecahnya plak (Collot-Teixeira *et al.* 2007; Warboys, 2011). Mekanisme terjadinya aterosklerosis melibatkan banyak faktor salah satunya adalah stress oksidatif,

gangguan metabolisme dan fungsi sel akibat peningkatan konsentrasi ROS yang bersifat sementara atau kronis (Poznyak *et al.* 2021).

ROS (*Reactive Oxygen Species*) didefinisikan sebagai molekul oksigen (O_2) yang menerima satu elektron dan diubah menjadi radikal yang sangat reaktif yang dapat merusak sel. ROS yang berlebihan akan mengoksidasi LDL (*low density lipoprotein*) ekstraseluler (Robin and Cotran 2015). ROS dari golongan *myeloperoxidase* dan *lipoperoxidase* bertanggung jawab untuk proses peroksidasi LDL. ROS yang berperan penting dalam patogenesis aterosklerosis adalah anion superoksida (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2), oksida nitrat (NO) dan peroksinitrit ($ONOO^-$)

(Alfarisi *et al.* 2020). LDL teroksidasi (ox-LDL) menyebabkan peningkatan regulasi VCAM, ICAM, E Selectin, P selectin, CS-1 yang mengakibatkan adesi platelet dan rekrutmen monosit serta limfosit T (CD4/CD8) di pembuluh darah yang selanjutnya akan memicu proses inflamasi kronis dan stres oksidatif pada endotel (Robin and Cotran 2015 ; Collot-Teixeira *et al.* 2007).

Scavenger receptor (SRs) CD36 adalah reseptor utama yang bertanggung jawab pada pengikatan dan penyerapan LDL-Ox di dalam makrofag dan endotel (Chen *et al.* 2022). CD36, *scavenger reseptor class B* yang diekspresikan oleh berbagai macam sel termasuk monosit, makrofag, sel endotel mikrovaskuler, adiposit, dan trombosit. CD36 diidentifikasi sebagai reseptor utama yang bertanggung jawab untuk mengikat ox-LDL ke dalam makrofag. CD36 berfungsi dalam penyerapan oxLDL dan penghambatan pembentukan sel busa, tahap kritis awal aterosklerosis. Selain itu, CD36 dapat menghambat migrasi makrofag (Park, 2014). Penghambatan CD36 akan mengakibatkan penurunan kemampuan makrofag untuk mengikat ox-LDL dan menghambat perkembangan lesi aterosklerotik. Hal ini menunjukkan bahwa CD36 berperan penting dalam perkembangan aterosklerosis dapat menjadi target penting untuk pengobatan terapeutik (Tian *et al.* 2015)

Malondyaldehyde (MDA) merupakan produk peroksidasi lipid yang dihasilkan selama stres oksidatif. MDA dapat memicu disfungsi endotel dengan menurunkan resistensi hidrolis pembuluh darah di bawah perubahan shear stress yang terjadi di dinding pembuluh darah (Lankin *et al.* 2022). MDA bersifat sangat reaktif dan memiliki kemampuan untuk memodifikasi susunan kimia LDL. Salah satu contoh modifikasi penting yang disebabkan oleh MDA adalah *dihydropyridine* (4-methyl-1,4

dihydropyridine-3,5-dicarbaldehyde) dengan asam amino lisin. Senyawa stabil ini berperan penting dalam aterosklerosis dan kondisi peradangan kronis lainnya (Samal *et al.* 2023).

Pencegahan aterosklerosis dapat dilakukan dengan berbagai cara salah satunya adalah pengaturan keseimbangan sistem pertahanan antioksidan tubuh. Buah naga merah merupakan salah satu buah yang memiliki kadar antioksidan tinggi sehingga dapat digunakan sebagai alternatif pencegahan atherosklerosis. Buah naga merah kaya anthosianin, polyfenol, dan fitoalbumin, serta mengandung mineral, serat, fosfor, dan kalsium. Biji buah naga merah juga mengandung vitamin E dan *polyunsaturated fatty acids*, vitamin C, dan antioksidan lainnya, terutama senyawa fenolik dan betalain (Mercado-Silva, 2018; Ariffin *et al.* 2009). Betalain dan betasianin dalam daging dan kulit buah naga merah merupakan senyawa berpigmen N-heterosiklik yang larut dalam air, mengandung asam betalamat sebagai gugus kromofor dan senyawa fenolik, yang memiliki aktivitas antioksidan tertentu (Angonese *et al.* 2021 ; Esquivel *et al.* 2007; Wu *et al.* 2006). Selain itu, buah naga merah memiliki vitamin C, karotenoid, fenolat, flavonoid, tanin dan antosianidin yang memiliki kemampuan untuk menangkap radikal bebas dan menghambat peroksidasi dan melindungi pembuluh darah dari stres oksidatif (Simirgiotis & Schmeda-Hirschmann, 2010; Wu *et al.* 2006)

Berdasarkan hal tersebut perlu dilakukan penelitian untuk mengungkap pengaruh suplementasi ekstrak etanol buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) terhadap hambatan atherogenesis pada mencit (*Mus musculus*) yang diberi diet tinggi lemak. Hambatan atherogenesis diukur melalui produk metabolit MDA dan ekspresi CD36.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini menggunakan rancangan eksperimental posttest control grup design.

Pembuatan Ekstrak Buah Naga Merah

Buah naga merah diperoleh dari Agrowisata Buah Naga Gading Asri di Kota Jember, Jawa Timur. Proses ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Buah naga merah di haluskan hingga berbentuk bubuk buah naga merah kemudian dimasukkan ke dalam gelas Erlenmeyer, ditambahkan dengan pelarut etanol 96% lalu dikocok selama 3 jam.

kemudian direndam dan ditutup dengan aluminium foil. Proses ekstraksi dilakukan secara maserasi selama 1x24 jam. Filtrat yang didapat dari proses penyaringan kemudian diuapkan pelarutnya dengan *rotary evaporator* pada suhu 50 °C hingga didapatkan ekstraksi kental yang bebas dari pelarut. Selanjutnya dilakukan proses *freeze drying* sehingga ekstrak kental berubah menjadi bubuk.

Penentuan Dosis Ekstrak

Penentuan dosis didasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Indirasari (2012) dengan menggunakan dosis 60 mg/200 gram BB sudah dapat memperbaiki profil lipid pada hewan coba tikus *hypercholesterolemia*. Dosis untuk mencit seberat 20gram didapatkan melalui konversi perhitungan dosis berdasarkan tabel konversi dari Laurence dan Bacharach (Legowo, 2002). Berdasarkan perhitungan diperoleh hasil sebanyak 8 mg / ekor. Diperlukan variasi dosis lebih untuk mengetahui tingkat efektivitas antiaterosklerotik ekstrak buah naga merah. Dosis ekstrak buah naga merah yang diberikan adalah 5 mg, 10 mg dan 20 mg/ekor/hari.

Diet Tinggi Lemak

Diet tinggi lemak yang diberikan dalam bentuk pellet dengan ransum yang terdiri dari diet ayam PAR-S dari PT. Japfa Comfeed Tbk., tepung terigu segitiga biru, kolesterol 1.888.bio Plus sebanyak 2 %, asam kholat Sigma M5M5306 0,2 %, minyak babi 5 % (Muwarni *et al.* 2006).

Pelaksanaan Perlakuan

Empat puluh ekor mencit jantan berumur 8-12 minggu dibagi dalam 5 kelompok secara acak: K0 (kontrol negative (diet standart)), K1(kontrol positif, diet tinggi lemak tanpa ekstrak), P1 (kelompok perlakuan dosis 5mg/ekor/hari), P2 (kelompok perlakuan dosis 10mg/ekor/hari), P3 (kelompok perlakuan dosis 20 mg/ekor/hari). Mencit diaklimatisasi dalam kandang kelompok selama 7 hari kemudian diaklimatisasi dalam kandang individu selama 7 hari. Pemberian pakan tinggi lemak sebanyak 15 gram/ ekor/ hari. K0 diberi diet standar hingga hari ke-56. K1, P1, P2, P3 diberi diet tinggi lemak selama 56 hari. Pemberian ekstrak etanol buah naga merah pada kelompok P1, P2 dan P3 dimulai pada minggu ke-4 hingga minggu ke-8 secara per oral dengan menggunakan sonde.

Pembuatan Sediaan Histopatologi

Setelah 56 hari perlakuan, mencit dikorbankan dengan cara dislokasi cervicalis. Setelah itu mencit diletakkan diatas meja bedah dengan keempat kakinya difiksasi. Diseksi dimulai dengan pembukaan kulit di regio torakalis hingga region servikalis. Beberapa lapis otot di regio servikalis yang terletak superfisial disisihkan atau dipotong (termasuk vena jugularis), hingga ditemukan trachea. Arteri carotis comunis kiri dan kanan terletak tepat mengapit trachea dan eosophagus di bagian proksimal. Setelah

arteri carotis comunis teridentifikasi maka dengan hati-hati dilakukan pengambilan pembuluh darah. Dimulai dari bagian paling proksimal atau kira-kira sejajar dengan pangkal trachea, arteri carotis comunis ditelusuri ke arah distal dan pembedahan arteri dilakukan dengan cara mengangkat semua otot yang terletak di sebelah superiornya. Jadi selain beberapa otot di region cervicalis, beberapa organ lain seperti trachea, oesophagus dan sebagian kelenjar tyroid dan parathyroid juga ikut terangkat. Sampel yang didapat, kemudian dimasukkan ke dalam larutan fiksasi (buffer phospat formalin 10%). Proses selanjutnya adalah pembuatan sediaan histologist. Sediaan histologist dipotong secara melintang yang dilanjutkan perendaman (*embedding*) jaringan dalam paraffin. Setelah itu dilakukan pembedahan dengan mikrotom tebal irisan 5 µm dan setiap sampel dibuat dalam jumlah yang banyak (dalam bentuk ribbon) lalu dipilih sediaan paling baik untuk selanjutnya dilakukan pewarnaan. Sediaan yang terpilih kemudian diwarnai dengan teknik Immunohistokimia.

Pengamatan ekspresi MDA dan CD36

Eksresi MDA dan CD36 pada

setiap sampel dinilai secara semi kuantitatif menurut Remmele and Stegnes (1986) yang sudah dimodifikasi. Indeks skala Remmele menggunakan Immuno Reactive Score (IRS) yang merupakan hasil perkalian antara prosentase sel imunoreaktif (A) dengan skor intensitas warna (B) pada sel imunoreaktif. Adapun kriteria prosentase sel imunoreaktif (A) adalah: skor 0 apabila tidak ada sel positif, 1 bila sel positif kurang dari 10%, 2 bila sel positif antara 11-50%, 3 bila sel positif antara 51-80%, dan 4 bila sel positif >80%.

Sedangkan, skor intensitas warna (B) dinilai: 0 apabila tidak ada reaksi warna, 1 bila intensitas warna rendah, 2 bila intensitas warna sedang, dan 3 bila intensitas warna kuat. Data sampel merupakan nilai rata-rata IRS (AxB) yang teramati pada pembesaran 1000x dalam 5 lapangan pandang (Nowak *et al.* 2007).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil uji produk metabolit MDA pada arteri carotis comunis mencit menunjukkan adanya penurunan pada tiap kelompok perlakuan (Tabel 1).

Tabel 1. Rerata dan Simpangan Baku Skor Produk Metabolit MDA pada Arteri Carotis Communis Mencit yang Diberi Diet Tinggi Lemak antara Kelompok Kontrol dan Kelompok yang Mendapat Ekstrak Buah Naga Merah

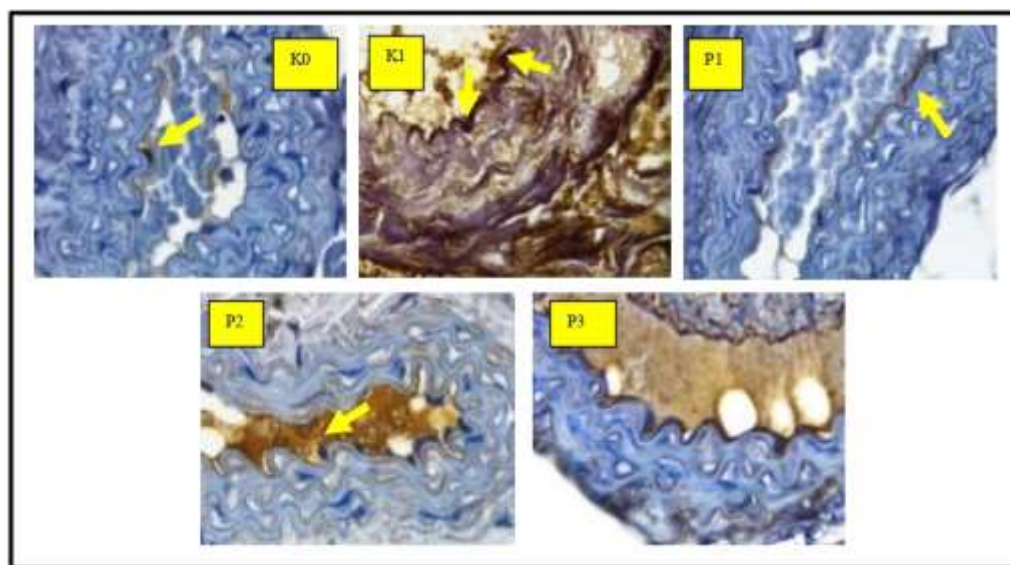
Produk Metabolit MDA (<i>Immuno Reactive Score</i>)				
K0	K1	P1	P2	P3
1±0.75	9.125±2.58	6.37±2.38	2±1.06	4.2±1.03

Tabel 1 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan rerata skor produk metabolit MDA antara kelompok kontrol K0, kelompok kontrol K1, kelompok perlakuan dosis P1, kelompok perlakuan dosis P2, dan kelompok perlakuan dosis P3. Perbedaan tersebut ditunjukkan oleh adanya penurunan rerata skor produk metabolit MDA pada

kelompok perlakuan P1 dan P2 dibandingkan kelompok kontrol K1. Sedangkan rerata skor produk metabolit MDA pada kelompok P3 lebih rendah dibandingkan kelompok P1 dan lebih tinggi dari kelompok P2. Rerata kelompok P2 mendekati rerata skor kelompok K0. Kelompok K1 memiliki rerata skor paling

tinggi, sedangkan kelompok K0 memiliki skor paling rendah. Hasil uji *Shapiro-Wilk* menunjukkan bahwa nilai p pada semua kelompok lebih dari 0,05 sehingga dapat disimpulkan data pada semua kelompok berdistribusi normal. Uji *Levene* menunjukan hasil $p=0,002$ ($p<0,05$) sehingga asumsi homogenitas data tidak terpenuhi. Data kemudian diuji dengan uji *Kruskal-Wallis* dan didapatkan hasil bahwa terdapat perbedaan skor produk metabolit MDA yang signifikan antara kelima kelompok dengan nilai $H=31,362$, 4 df dan $p=0,000$ ($p<0,05$). Uji *Mann-Whitney* dilakukan untuk melihat perbedaan antara nilai dua kelompok. Hasil uji *Mann-Whitney* dianggap bermakna apabila nilai $p<0,05$. Berdasarkan hasil uji *Mann-Whitney*, diketahui bahwa kelompok control K0 memiliki perbedaan skor produk metabolit MDA yang bermakna dengan kelompok kontrol K1 ($p= 0,001$, $p<0,05$) dan kelompok perlakuan pemberian ekstrak etanol buah naga merah P1 dan P3 ($p= 0,001$, $p<0,05$), namun tidak berbeda bermakna dengan P2 ($p= 0,058$, $p>0,05$).

Kelompok kontrol K1 memiliki perbedaan skor produk metabolit MDA yang bermakna dengan kelompok kontrol K0 ($p= 0,001$, $p<0,05$) dan kelompok perlakuan pemberian ekstrak etanol buah naga merah, P2 dan P3 ($p=0,001$, $p<0,05$), namun tidak berbeda bermakna dengan P1 ($p= 0,075$, $p<0,05$). Kelompok perlakuan P1 memiliki perbedaan skor produk metabolit MDA yang bermakna dengan kelompok kontrol K0 ($p= 0,001$, $p<0,05$) dan kelompok P2 ($p= 0,003$, $p<0,05$) dan P3 ($p= 0,049$, $p<0,05$), namun tidak berbeda bermakna dengan K1 ($p= 0,075$, $p>0,05$). Kelompok P2 memiliki perbedaan skor produk metabolit MDA yang bermakna dengan kelompok kontrol K1 ($p= 0,001$, $p<0,05$) dan kelompok P1 dan P3 ($p= 0,003$, $p<0,05$), namun tidak berbeda bermakna dengan K0 ($p= 0,058$, $p>0,05$). Kelompok P3 memiliki perbedaan skor produk metabolit MDA yang bermakna dengan kelompok kontrol K0 dan K1 ($p= 0,001$, $p<0,05$), serta kelompok perlakuan pemberian P1 ($p= 0,049$, $p<0,05$) dan P2 ($p= 0,003$, $p<0,05$).



Gambar 1. Perbedaan Produk Metabolit MDA (Panah Kuning) Antar Kelompok Menggunakan Pewarnaan *Imunohistokimia*, Pembesaran 1000x, Mikroskop Nikon H600L; Kamera DS Fi2 300 Megapixel.

Hasil presentase produk metabolite MDA memperlihatkan kelompok perlakuan kontrol negatif (K0) memiliki jumlah paling rendah (1 ± 0.75). MDA ditemukan juga pada sel normal karena radikal bebas oksigen yang terlibat dalam peroksidasi PUFA juga diproduksi dalam metabolite sel normal (Pasupathi *et al.* 2009).

Kelompok kontrol positif diet tinggi lemak (K1) memiliki presentase ekspresi MDA paling tinggi ($9,1250 \pm 2,58$) dari semua kelompok. Hal ini disebabkan karena sel mengalami kondisi hiperkolesterolemia dengan konsekuensi peningkatan stress oksidatif sel yang dapat dinilai dengan produk metabolite MDA (Suryohudoyo, 2000). MDA bersifat lebih stabil yang memiliki waktu hidup lebih lama, sehingga dapat digunakan sebagai biomarker stres oksidatif (Gambar 1) (Sawitri, 2011; Cherubini *et al.* 2005).

Kelompok ekstrak 5 mg/ekor/hari mulai menunjukkan penurunan produk metabolite MDA dibandingkan dengan kelompok K1. Pemberian ekstrak buah naga merah sebanyak 5mg/ekor/hari sudah dapat memberikan pengaruh terhadap penurunan produk metabolite MDA. Buah naga merah berpotensi untuk menetralkan radikal lipid melalui vitamin E, enzim glutathion peroksidase, dan superoksida dismutase melalui pemberian atom hidrogen (Mathews *et al.* 2000). Ekstrak buah naga dapat menurunkan serum lipid dan MDA-TBAR hati tikus hiperkolesterolemia (Sani, 2009).

Vitamin E yang terdapat pada buah naga berperan penting dalam penurunan peroksida lipid dan mengurangi resiko penyakit kardiovaskuler (Mathews *et al.* 2000). Vitamin C merupakan antioksidan yg larut air, melindungi komponen intraseluler dan ekstraseluler dan berperang penting untuk menangkap radikal tokoferol dalam bentuk aktif (Kaur dan Kapoor, 2001). Vitamin C menghambat peroksidase yang

terjadi pada stres oksidatif sehingga menurunkan MDA (Morrow dan Roberts, 2002). Polifenol, flavonoid, β sianin, mempunyai peran penting juga sebagai antioksidan buah (Wu *et al.* 2006) yang bertindak sebagai penangkap oksigen (*oxygen scavenger*). Gugus hidroksil yang tinggi didalam struktur fenolid akan meningkatkan aktivitas antioksidannya (Liorach *et al.* 2008). Diet polifenol dan flavonoid, mengurangi modifikasi atherogenik LDL yang akan membentuk *foam cell* (Fuhrman dan Aviram, 2001).

Karotenoid berperan dalam pencegahan penyakit degeneratif dengan cara mempertahankan sistem imun (Halliwell dan Gutteridge, 2015), mempertahankan siklus sel, meningkatkan komunikasi sel, menghambat transformasi malignant dalam sel C3H/10T1/2, serta memacu apoptosis dan deferensiasi, selain itu ekstrak etanol buah naga merah mampu menurunkan efek toksik dari senyawa oksigen reaktif yang berimplikasi dalam etiologi penyakit degeneratif seperti kanker, kardiovaskuler, neuro degeneratif dan aging (Chew and Park, 2004). Kelompok P1 menunjukkan hasil yang berbeda bermakna dengan kelompok K0 dan P2 tetapi tidak berbeda bermakna dengan P3 (nilai $p = 0.222$, $p > 0.05$) karena pada kedua dosis tersebut, zat antioksidan dalam ekstrak buah naga merah masih belum efektif dalam menurunkan produk metabolite MDA. Kelompok P1 juga tidak berbeda bermakna dengan K1 (nilai $p = 0.232$, $p > 0.05$). Hal ini disebabkan karena dosis 5mg/ekor/hari hanya mampu menurunkan skor produk metabolite MDA sebanyak 30.13%.

Kelompok ekstrak 10mg/ekor/hari (P2) menunjukkan penurunan produk metabolite MDA paling banyak dibandingkan dengan kelompok kontrol K1 yaitu 78,08%. Kelompok P2 menunjukkan hasil yang tidak berbeda bermakna dengan kelompok K0 dengan nilai $p = 0,255$

($p > 0,05$). Hal ini dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak sebanyak 10 mg/ekor/hari mampu menurunkan produk metabolite MDA secara efektif dan mendekati nilai normal K0. Buah naga mempunyai kandungan antosianin yang dibutuhkan oleh tubuh manusia. Kadar antosianin berkisar 8,8 mg/100gr buah naga (Wu *et al.* 2006). Di Malaysia, buah naga banyak digunakan sebagai zat pewarna alami untuk makanan dan industri kosmetik, penawar racun, mencegah sembelit, dan membantu penyerapan lemak yang berlebihan dalam darah. Juga dapat menghalangi munculnya sel kanker serta baik untuk dikonsumsi oleh penderita jantung koroner (Stintzing *et al.* 2002; Indirasari, 2012).

Flavonoid dalam buah naga merah dapat menekan MDA pada mencit yang diberi diet tinggi lemak, memang tidak dapat diketahui secara pasti namun hal tersebut dapat terjadi melalui beberapa mekanisme yang sudah diketahui antara lain, yaitu (1) sebagai antioksidan pencegah (*preventing antioxidant*) dengan cara mencegah terjadinya peroksidasi LDL (gugus hidroksil (-OH) dari flavonoid dapat menangkap ROS (radikal hidroksi (OH^{*}), ONOOH dan HOCL) secara langsung, (2) mencegah terjadinya perambatan reaksi peroksidasi

(*chain breaking antioxidant* atau *chain breaking peroxy radical scavenger*) dengan cara menangkap radikal peroksil (ROO^{*}) sehingga dapat menghentikan reaksi peroksidasi lebih lanjut. Secara in vitro, flavonoid dapat berkojugasi ke dalam molekul LDL meskipun dalam jumlah yang sangat sedikit. (3) secara in vitro, flavonoid dapat menghambat uptake glukosa dan mencegah peroksidasi lipid yang diinduksi oleh glukosa (Legowo, 2002).

Kemampuan ekstrak buah naga merah terhadap penurunan produk metabolite MDA mengalami penurunan pada dosis 20mg/ekor/hari (P3) dibanding dengan dosis yang lain. Nilai penurunan pada dosis 20mg/ekor/hari dibandingkan dengan K1 sebanyak 53.42%. Dosis 20mg/ekor/hari mengalami penurunan efektifitas. Penurunan efektifitas dari ekstrak buah naga merah diduga disebabkan oleh adanya peningkatan aktifitas dari enzim pemetabolite fase II, yakni *Glutation S- transferase* (GST). GST berperan dalam detoksifikasi senyawa xenobiotik di dalam tubuh melalui konjugasi dengan *Glutation* (GSH). Aktivitas GST yang meningkat akan mempercepat proses metabolite sehingga masa kerja dan efek obat dalam organ atau jaringan akan menurun (Stintzing *et al.* 2002).

Tabel 2. Rerata dan Simpangan Baku Skor Ekspresi CD36 pada Arteri Carotis Communis Mencit yang Diberi Diet Tinggi Lemak antara Kelompok Kontrol dan Kelompok yang Mendapat Ekstrak Buah Naga Merah

Ekspresi CD36 (<i>Immuno Reactive Score</i>)				
K0	K1	P1	P2	P3
0.75±0.70	9.25±2.54	3.12±1.55	1.12±1.12	4±1.30

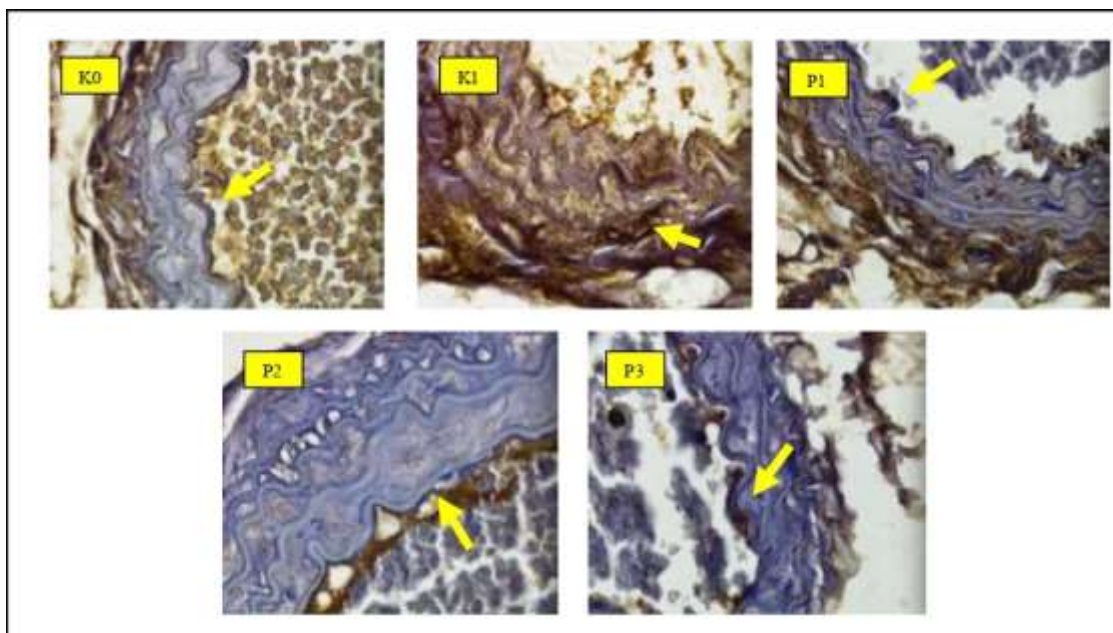
Tabel 2 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan rerata skor ekspresi CD36 antara kelompok kontrol K0, kelompok kontrol K1, kelompok perlakuan dosis P1, kelompok perlakuan dosis P2, dan kelompok perlakuan dosis P3. Perbedaan tersebut ditunjukkan oleh adanya penurunan rerata skor ekspresi CD36

pada kelompok perlakuan P1 dan P2 dibandingkan kelompok kontrol K1. Sedangkan rerata skor ekspresi CD36 pada kelompok P3 merupakan skor tertinggi diantara kelompok perlakuan P1 dan P2. Rerata kelompok P2 mendekati rerata skor kelompok K0. Kelompok K1 memiliki

rerata skor paling tinggi, sedangkan kelompok K0 memiliki skor paling rendah. Hasil uji *Shapiro-Wilk* menunjukkan bahwa nilai p pada semua kelompok lebih dari 0,05 sehingga dapat disimpulkan data pada semua kelompok berdistribusi normal. Uji *Levene* menunjukan hasil $p=0,016$ ($p<0,05$) sehingga asumsi homogenitas data tidak terpenuhi. Data kemudian diuji dengan uji *Kruskall-Wallis* dan didapatkan hasil bahwa terdapat perbedaan perbedaan skor ekspresi CD36 yang signifikan antara kelima kelompok dengan nilai $H=30.864$, 4 df dan $p=0,000$ ($p<0,05$).

Berdasarkan hasil uji *Mann-Whitney*, diketahui bahwa kelompok kontrol K0 memiliki perbedaan skor ekspresi CD36 yang bermakna dengan kelompok kontrol K1 ($p= 0,001$, $p<0,05$) dan kelompok perlakuan pemberian ekstrak etanol buah naga merah P1 ($p= 0,003$, $p<0,05$) dan P3 ($p= 0,001$, $p<0,05$), namun tidak berbeda secara bermakna dengan P2 ($p= 0,541$,

$p>0,05$). Kelompok kontrol K1 memiliki perbedaan skor ekspresi CD36 yang bermakna dengan kelompok kontrol K0 ($p= 0,001$, $p<0,05$) dan kelompok perlakuan pemberian ekstrak etanol buah naga merah P1, P2 dan P3 ($p=0,001$, $p<0,05$). Kelompok perlakuan P1 memiliki perbedaan skor ekspresi CD36 yang bermakna dengan kelompok kontrol K0 ($p= 0,003$, $p<0,05$), K1 ($p=0,001$, $p<0,05$), kelompok P2 ($p= 0,014$, $p<0,05$) dan tidak berbeda bermakna dengan P3 ($p= 0,218$, $p<0,05$). Kelompok P2 memiliki perbedaan skor ekspresi CD36 yang bermakna dengan kelompok kontrol K1 ($p= 0,001$, $p<0,05$), P1 ($p= 0,014$, $p<0,05$) dan P3 ($p= 0,002$, $p<0,05$), namun tidak berbeda bermakna dengan K0 ($p= 0,541$, $p>0,05$). Kelompok P3 memiliki perbedaan skor ekspresi CD36 yang bermakna dengan kelompok kontrol K0 dan K1 ($p= 0,001$, $p<0,05$), P2 ($p= 0,002$, $p<0,05$), namun tidak berbeda bermakna dengan P1 ($p=0,218$, $p<0,05$).



Gambar 2. Perbedaan Ekspresi CD36 (Panah Kuning) Antar Kelompok Menggunakan Pewarnaan *Imunohistokimia*, Pembesaran 1000x, Mikroskop Nikon H600L; Kamera DS Fi2 300 Megapixel.

Hasil ekspresi CD36 memperlihatkan kelompok perlakuan kontrol negatif (K0) memiliki jumlah paling rendah (0.75 ± 0.70). CD36 adalah heavily glycosylated 88-kD class B scavenger receptor yang diekspresikan di permukaan berbagai sel imun innate and adaptive, termasuk makrofag, monosit, sel dendritik (DC), subset sel T dan B dan sel non-imun termasuk trombosit, immature erythrocytes, adiposit, miosit, sel epitel khusus tertentu, dan sel endotel mikrovaskuler. CD36 berfungsi sebagai reseptor sinyal dan pengangkut asam lemak di berbagai sel imun dan non-imun (Chen *et al.* 2022). Berdasarkan hal tersebut, maka dapat dikatakan bahwa CD36 berada dan dapat terekspresi di sel normal mencit yang tidak diberi perlakuan (Gambar 2).

Kelompok kontrol positif diet tinggi lemak (K1) memiliki ekspresi CD36 paling tinggi (9.25 ± 2.54) dari semua kelompok. Hal ini disebabkan karena sel mengalami kondisi stress oksidatif. Fatty acid translocase/cluster of differentiation 36 (FAT/CD36) berada di permukaan sel dan dapat diaktifkan oleh pemberian diet tinggi lemak, latihan fisik, asam lemak (FA), leptin, dan insulin. FAT/CD36 sangat terekspresi ketika hewan coba diberi oleh diet tinggi lemak akibat dari pengaktifan LCFA, Ca^{2+} , fosforilasi AMPK, dan leptin. Polimorfisme dan kegagalan pada transkripsi dan translasi CD36 dapat mengubah metabolisme lipid normal dan menyebabkan berbagai penyakit termasuk. Sebuah penelitian dengan menggunakan cross-sectional design menunjukkan bahwa makanan tinggi lemak dapat meningkatkan ekspresi dan jumlah protein CD36 di otot rangka. Selain itu, ekspresi dan kuantitas protein FAT/CD36 pada otot rangka dikaitkan dengan peningkatan aktivasi gen, sintesis dan aktivasi protein transpor FA, oksidasi FA, dan hidrolisis lipid (Jimenez *et al.* 2023). Kelompok ekstrak 5 mg/ekor/hari

mulai menunjukkan penurunan ekspresi CD36 dibandingkan dengan kelompok K1. Vitamin E merupakan antioksidan larut lemak yang paling banyak diteliti di manusia. Vitamin E terdiri dari delapan senyawa isomer (α -, β -, γ -, dan δ - tokoferol; dan α -, β -, γ -, dan δ -tocotrienol). Buah naga merah merupakan salah satu buah yang memiliki kandungan vitamin E yang tinggi. Pada beberapa model hewan coba, vitamin E memiliki efek pencegahan terhadap aterosklerosis dengan cara menangkalkan radikal bebas di VSMC, mengurangi oksidasi LDL dengan menghambat ekspresi Cluster Differentiating 36 (CD36) dan Scavenger receptor class B tipe I (SR-BI) di VSMC (Malekmohammad *et al.* 2019).

Kelompok P1 menunjukkan hasil yang berbeda bermakna dengan kelompok K0, K1 dan P2 tetapi tidak berbeda bermakna dengan P3 ($p = 0,218$, $p < 0,05$) karena pada dosis P1, zat antioksidan dalam ekstrak buah naga merah masih belum efektif dalam menurunkan ekspresi CD36, sedangkan pada dosis P3 efektifitas antioksidan dalam buah naga merah mulai menurun. Kelompok P1 berbeda bermakna dengan K1 ($p = 0,001$, $p < 0,05$). Hal ini disebabkan karena dosis 5mg/ekor/hari sudah mampu menurunkan skor ekspresi CD36 sebanyak 33,72%. Kelompok ekstrak 10mg/ekor/hari (P2) menunjukkan penurunan ekspresi CD36 paling banyak dibandingkan dengan kelompok kontrol K1 yaitu 81,3%. Kelompok P2 menunjukkan hasil yang tidak berbeda bermakna dengan kelompok K0 dengan nilai $p = 0,541$, $p > 0,05$. Hal ini dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak sebanyak 10 mg/ekor/hari mampu menurunkan ekspresi CD36 secara efektif dan mendekati nilai normal K0. Naga merah memiliki kandungan betalain dan senyawa bioaktif lainnya seperti vitamin dan senyawa fenolik yang memberikan sifat antioksidan yang relevan. Oleh karena itu, buah naga merah telah terbukti dapat digunakan

sebagai alternatif pencegahan beberapa penyakit di manusia. Minyak dari biji buah naga merah, dan kulitnya merupakan sumber senyawa antioksidan yang penting. Ekstrak pulp buah naga merah dapat menurunkan kerusakan oksidatif pada diabetes yang diinduksi STZ pada tikus.

Selain itu, antioksidan pada buah naga merah juga dapat bertindak sebagai anti-inflamasi. Niah dan Baharsyah (2018) mengungkapkan bahwa antosianin (*cyanidin 3-glukosida*, *delphinidin 3-glukosida*, dan *pelargonidin 3-glukosida*) pada daging buah dan kulit buah naga merah dapat menghambat sintesis spesies oksigen reaktif dan nitrogen, *siklooksigenase-2* (COX-2), dan *inducible nitric oxide synthase* (iNOS), dalam model in vitro dan tanpa menyebabkan sitotoksitas. Studi lain menunjukkan bahwa ekstrak daging dan kulit naga serta squalene yang diisolasi menyebabkan penghambatan enzim proinflamasi seperti siklooksigenase-2, lipoksigenase dan asetilkolinesterase dan menyimpulkan bahwa buah naga merah dapat menghasilkan potensi yang signifikan untuk pengendalian dan pengelolaan proses inflamasi melalui jalur berbeda seperti jalur prostaglandin, leukotrien, dan kolinergik. Amim et al. menemukan efek yang berbeda (aksi anti-inflamasi, antioksidan dan anti-bakteri) dalam ekstrak H. polyrhizus dan H. undatus (ekstrak air H. polyrhizus menunjukkan efek paling signifikan dibandingkan H. undatus) (Nishikito et al. 2023).

Antioksidan adalah molekul yang mampu “menetralkan” oksidasi ROS sebelum bereaksi dengan biomolekul seluler dan mengubah struktur atau fungsinya. Pertahanan antioksidan memiliki dua tingkatan yaitu melalui mekanisme pertahanan primer dengan menghambat kerusakan oksidatif secara langsung dengan menangkap radikal bebas sebelum radikal tersebut dapat merusak biomolekul

intraseluler. Enzim endogen memainkan peran penting dalam langkah ini dan mekanisme pertahanan sekunder (pertahanan pemutusan rantai) seperti Vitamin C, vitamin E bekerja dengan cara menangkap radikal bebas sebagai bagian dari sistem pertahanan sekunder. Selain itu, nuclear enzim yang berpartisipasi dalam perbaikan DNA dapat dianggap sebagai sistem pertahanan sekunder terhadap kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh oksigen radikal bebas. Efek perlindungan dari antioksidan yang berbeda dapat menghambat proses pembentukan plak atherogenesis padapenyakit aterosklerosis (Malekmohammad et al. 2019).

KESIMPULAN

Ekstrak etanol buah naga merah dapat digunakan sebagai alternative pencegahan aterosklerosis melalui penurunan produk metabolit MDA dan ekspresi CD36 di arteri carotis communis.

DAFTAR PUSTAKA

- Alfarisi, H. A. H., Mohamed, Z. B. H., & Ibrahim, M. B. (2020). Basic pathogenic mechanisms of atherosclerosis. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 7(1), 116-125.
- Ariffin, A. A., Bakar, J., Tan, C. P., Rahman, R. A., Karim, R., & Loi, C. C. (2009). Essential fatty acids of pitaya (dragon fruit) seed oil. *Food chemistry*, 114(2), 561-564.
- Angonese, M., Motta, G. E., de Farias, N. S., Molognoni, L., Daguer, H., Brugnerotto, P., & Müller, C. M. O. (2021). Organic dragon fruits (*Hylocereus undatus* and *Hylocereus polyrhizus*) grown at the same edaphoclimatic conditions: Comparison of phenolic and organic acids profiles and antioxidant activities. *Lwt*, 149, 111924.
- Batty, M., Bennett, M. R., & Yu, E. (2022). The role of oxidative stress in atherosclerosis. *Cells*, 11(23), 3843.
- Chen, Y., Zhang, J., Cui, W., & Silverstein, R. L. (2022). CD36, a signaling receptor and fatty acid transporter that regulates immune cell metabolism and fate. *Journal of Experimental Medicine*, 219(6), e20211314.
- Cherubini, A., Ruggiero, C., Polidori, M. C., & Mecocci, P. (2005). Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radical Biology and Medicine*, 39(7), 841-852.

- Chew, B. P., & Park, J. S. (2004). Carotenoid action on the immune response. *The Journal of nutrition*, 134(1), 257S-261S.
- Esquivel, P., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2007). Phenolic compound profiles and their corresponding antioxidant capacity of purple pitaya (*Hylocereus* sp.) genotypes. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 62(9-10), 636-644.
- Fuhrman, B., & Aviram, M. (2001). Polyphenols and Flavonoids Protect LDL Against Atherogenic Modifications. In *Handbook of antioxidants* (pp. 322-355). CRC Press.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press, USA.
- Kaur, C., & Kapoor, H. C. (2001). Antioxidants in fruits and vegetables—the millennium's health. *International journal of food science & technology*, 36(7), 703-725.
- Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K., & Melkumyants, A. M. (2022). Malondialdehyde as an important key factor of molecular mechanisms of vascular wall damage under heart diseases development. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 128.
- Legowo, D. (2002). *Efek Pemberian Isoflavonoid Terhadap Kadar MDA Plasma Darah dan Ketebalan Tunika Intima-media A. Carotis Communis Tikus Putih Jantan Yang Diberi Stressor* (Doctoral dissertation, Universitas Airlangga).
- Malekmohammad, K., Sewell, R. D., & Rafieian-Kopaei, M. (2019). Antioxidants and atherosclerosis: mechanistic aspects. *Biomolecules*, 9(8), 301.
- Morrow, J. D., & Roberts, L. J. (2002). Mass spectrometric quantification of F 2-isoprostanes as indicators of oxidant stress. *Oxidative stress biomarkers and antioxidant protocols*, 57-66.
- Mathews, F., Yudkin, P., Smith, R. F., & Neil, A. (2000). Nutrient intakes during pregnancy: the influence of smoking status and age. *Journal of Epidemiology & Community Health*, 54(1), 17-23.
- Mercado-Silva, E. M. (2018). Pitaya—*Hylocereus undatus* (haw). *Exotic fruits*, 339-349.
- Niah, R., & Baharsyah, R. N. (2018). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Kulit Buah Naga Merah Super (*Hylocereus costaricensis*). *Jurnal Pharmascience*, 5(1).
- Nowak, M., Madej, J. A., & Dziegiel, P. (2007). Intensity of COX2 expression in cells of soft tissue fibrosarcomas in dogs as related to grade of tumour malignancy. *Bulletin-veterinary institute in pulawy*, 51(2), 275.
- Nishikito, D. F., Borges, A. C. A., Laurindo, L. F., Otoboni, A. M. B., Direito, R., Goulart, R. D. A., ... & Barbalho, S. M. (2023). Anti-inflammatory, antioxidant, and other health effects of dragon fruit and potential delivery systems for its bioactive compounds. *Pharmaceutics*, 15(1), 159.
- Poznyak, A. V., Nikiforov, N. G., Markin, A. M., Kashirskikh, D. A., Myasoedova, V. A., Gerasimova, E. V., & Orekhov, A. N. (2021). Overview of OxLDL and its impact on cardiovascular health: focus on atherosclerosis. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 613780.
- Park, Y. M. (2014). CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis. *Experimental & molecular medicine*, 46(6), e99-e99.
- Pasupathi, P., Chandrasekar, V., & Kumar, U. S. (2009). Evaluation of oxidative stress, antioxidant and thyroid hormone status in patients with diabetes mellitus. *Journal of Medicine*, 10(2), 60.
- Suryohudoyo, P. (2000). *Kapita selekta ilmu kedokteran molekuler*. Perpustakaan Nasional RI. Jakarta, CV Sagung Seto, p 31-47
- Sawitri, I. G. A. D. (2011). *Pemberian Ekstrak Buah Mahkota Dewa (Phaleria Macrocarpa) Menurunkan Kadar Malondialdehid Darah Tikus Putih (Rattus Norvegicus) Yang Diinduksi Aktivitas Fisik Berlebih* (Doctoral dissertation, Tesis. Universitas Udayana. Denpasar).
- Samal, S. K., Leander, K., Vikström, M., Griesbaum, L., de Faire, U., & Frostegård, J. (2023). Antibodies against malondialdehyde among 60-year-olds: prediction of cardiovascular disease. *Scientific Reports*, 13(1), 15011.
- Collot-Teixeira, S., Martin, J., McDermott-Roe, C., Poston, R., & McGregor, J. L. (2007). CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovascular research*, 75(3), 468-477.
- Tian, H., Sun, H. W., Zhang, J. J., Zhang, X. W., Zhao, L., Guo, S. D., & Yao, S. T. (2015). Ethanol extract of propolis protects macrophages from oxidized low density lipoprotein-induced apoptosis by inhibiting CD36 expression and endoplasmic reticulum stress-C/EBP homologous protein pathway. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15, 1-12.
- Wu, L. C., Hsu, H. W., Chen, Y. C., Chiu, C. C., Lin, Y. I., & Ho, J. A. A. (2006). Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. *Food chemistry*, 95(2), 319-327.
- Warboys, C. M., Amini, N., de Luca, A., & Evans, P. C. (2011). The role of blood flow in determining the sites of atherosclerotic plaques. *F1000 medicine reports*, 3