

**OPTIMALISASI DOSIS EKSTRAK BUNGA ROSELLA MERAH
(*Hibiscus sabdariffa* Linn) SEBAGAI ANTI ATEROSKLEROSIS
UNTUK MENGHAMBATAKTIFASI $NF-\kappa\beta$, $TNF-\alpha$
DAN $ICAM-1$ PADA KULTUR SEL ENDOTHEL YANG DIPAPAR
LOW DENSITY LIPOPROTEIN TEROKSIDASI**

**OPTIMALITATION OF DOSIS FOR RED ROSELLA FLOWER
AS ANTI ATHEROSCLEROSIS TO MEDIATED INHIBITION
OF $NF-\kappa\beta$ ACTIVATION, $TNF-\alpha$ AND $ICAM-1$ - PROTEIN
EXPRESSIONS IN OX-LDL-TREATED VENA
ENDOTHELIAL CULTURED CELL**

Dwi Sarbini

Program Studi Gizi Fakultas Ilmu Kesehatan
Universitas Muhammadiyah Surakarta
Jl. A. Yani Tromol Pos I Pabelan Surakarta
Telp. (0271)717417 ex.141

ABSTRAK

Penyakit jantung aterosklerosis saat ini menjadi ancaman global. Melihat patomekanisme aterosklerosis, ox-LDL merupakan salah satu penyebab utama proses atherogenesis diantaranya melalui pembentukan ROS yang akan mengaktifasi $NF-\kappa\beta$ dan merangsang ekspresi protein ($TNF-\kappa\beta$ dan $ICAM-1$) serta akan memicu terjadinya inflamasi pada aterosklerosis. Teh Rosella Merah diduga mempunyai efek pada jalur ini, namun hal ini perlu dibuktikan berikut dosis pemberiannya. Teh Rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* L.) telah dibuktikan invitro dan in vivo mempunyai aktifitas antioksidan oleh kandungan senyawa penoliknya (protocatechuic acid dan antosianin) dan vitamin C. Mekanisme kerja dari teh rosella merah pada penghambatan atherogenesis belum banyak diketahui. Sebagai model penelitian menggunakan kultur sel endotel yang diisolasi dari vena umbilikalis manusia (HUVECs). Kelompok perlakuan terdiri dari 8 perlakuan yaitu HUVECs tanpa paparan ox-LDL untuk kontrol negatif dan HUVECs yang dipapar Ox-LDL sebagai kontrol positif, HUVECs yang dipapar dengan berbagai dosis teh rosella merah (0.2 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.005 mg/ml dan 0.001 mg/ml) yang diberikan selama 2 (dua) jam sebelum dipapar ox-LDL. Dosis

OxLDL yang digunakan adalah 40 μ g/ml and 50 μ g/ml. Dari hasil analisis dapat disimpulkan bahwa dosis yang tepat dan aman dari ekstrak bunga Rosella Merah untuk kultur sel endothel vena umbilikalis manusia adalah dosis 0.01 mg/ml, 0.005 mg/ml dan 0.001 mg/ml. Sedangkan dosis yang tepat dari LDL teroksidasi untuk mengaktifasi NF- κ B, ekspresi protein TNF- α dan ekspresi protein ICAM-1 serta tidak bersifat toksik bagi sel endothel adalah 40 μ g/ml.

Kata Kunci: Atherosclerosis, Oxidized-LDL, Teh Rosella Merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn), aktivasi NF- κ B, ekspresi protein TNF- α , ekspresi protein ICAM-1

ABSTRACT

The atherosclerosis disease has recently been a global threat. Seeing the atherosclerosis pathomechanism, Ox-LDL was one of major source of atherogenesis process through the ROS formation as among other which would activate NF- κ B and encouraged protein expression (TNF- α and ICAM-1) leading to the occurrence of inflammation in atherosclerosis disease. Rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) was considered having effect on this track, but it still need to be proven together with its dosage. Recent studies indicate that Rosella is a tropical plant containing antioxidant, that is polyphenol compound (protocatechuic acid and antocyanin) and ascorbate acid invitro and invivo, and is widely distributed in Indonesia. The work mechanism of the red tea on the atherogenesis inhibition has not been largely known. Cultured endothelial cell (HUVECs), is used for a model of endothelial cells. On 8 treated groups, that was the group of HUVECs culture without presenting Ox-LDL as negative control; groups with Ox-LDL presentation (dosage was according to exploratory research) as positive control; groups given the Rosella tea abstract with various dosages (0.2 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.005 mg/ml dan 0.001 mg/ml) then being presented Ox-LDL. 40 μ g/ml and 50 μ g/ml of Ox-LDL is treated on HUVECs to stimulate responds of endothelial cells mimicking dyslipidemia condition. The Red Rosella tea in a various dose, and a vehicle for control, were given 2 h before Ox-LDL treatment. The red rosella tea treatment on Ox-LDL-treated HUVECs, insafe and adequate dose, may result in prevention NF- κ B activation of in respond to OxLDL treatment, is 0.01 mg/ml, 0.005 mg/ml and 0.001 mg/ml dosages. Dosage of OxLDL is 40 μ g/ml.

Keywords: Atherosclerosis, Oxidized-LDL, the red Rosella Flower (*Hibiscus sabdariffa* Linn), NF- κ B activation, TNF- α protein expression, ICAM-1 protein expression

PENDAHULUAN

Penyakit kardiovaskuler menjadi masalah kesehatan di dunia dan di Indonesia. Di samping itu, sebagai penyebab kematian utama di dunia sampai tahun 2020, termasuk juga penyakit jantung koroner dan pembuntuan pembuluh darah otak yang diantaranya disebabkan oleh aterosklerosis (Tjokroprawiro, 2002).

Telah dibuktikan bahwa aterosklerosis merupakan proses inflamasi/keradangan kronis yang dihasilkan sel radang. Salah satunya dipicu oleh modifikasi *Low Density Lipoprotein (LDL)* yang poten sebagai penyebab aterosklerosis adalah *oxidized LDL* (Ross, 1999).

Oxidized LDL (Ox-LDL) meningkatkan ROS (*Reactive Oxygen Species*). *Ox-LDL* bersifat sitotoksik dan berfungsi sebagai kemotaksis faktor bagi monosit yang mengakibatkan penumpukan sel sel radang, Keradangan terjadi karena *Ox-LDL* mengaktifkan faktor transkripsi *Nuclear Factor Kappa Beta (NF- κ B)*. *NF- κ B* yang teraktifasi akan menginduksi terbentuknya protein-protein sistem imun dan molekul/ zat perantara yang pada akhirnya meningkatkan progresifitas aterosklerosis atau memicu ruptur dari plak aterosklerosis dan mengakibatkan pembuntuan arteri koroner (infark miokard), pembuluh darah otak (stroke) dan lain-lain (Collins dkk, 2001). Mengingat peradangan menjadi faktor utama dari patogenesis aterosklerosis maka *NF- κ B* terlibat dalam patogenesis aterosklerosis dengan merangsang sel radang dan molekul adesi maka pencegahan dan pengobatannya dapat di mulai dengan penghambatan aktivasi protein penting yang menimbulkan proses peradangan, yaitu *NF- κ B* sebagai targetnya (Krause dkk, 2002).

Upaya pencegahan melalui obat-obatan, misalnya golongan statin relatif mahal sehingga diperlukan upaya pencegahan yang memerlukan pembiayaan lebih murah (*cost effective*), diantaranya dengan pemanfaatan tumbuhan daerah tropis sebagai salah satu target pengembangan pemakaian fitofarmaka baru mengingat Indonesia merupakan negara tropis.

Salah satu tumbuhan tropis yang dapat digunakan sebagai fitofarmaka untuk pencegahan terjadinya atherosklerosis adalah bunga Rosella Merah (*Hibiscus sabdariffa Linn.*) yang mempunyai aktifitas antioksidan. Hal ini didukung oleh keistimewaan *Hibiscus sabdariffa Linn* yang mudah dibudidayakan di berbagai jenis tanah terutama di daerah tropis dan tidak memerlukan banyak air (Duke, 1998). Bunga Rosella Merah (*Hibiscus sabdariffa Linn*) mengandung nutrisi yang cukup tinggi, diantaranya protein, lemak, serat, kalsium, niasin, riboflavin, besi, karoten, tiamin, dan vitamin C yang baik untuk kesehatan sehingga dapat dikembangkan sebagai sumber nutrisi. Di Indonesia jumlahnya melimpah namun pemanfaatannya masih terbatas.. *Hibiscus sabbdariffa Linn* telah

banyak dikenal di negara India, Jamaica, Inggris, Taiwan, Jepang, Filipina, Malaysia, dan negara Eropa sebagai tanaman yang dapat menyehatkan dan bermanfaat sebagai obat. Namun data pemanfaatannya untuk berbagai penelitian sebagai tanaman yang berkhasiat bagi kesehatan belum banyak tersedia, khususnya di Indonesia. Penelitian oleh Chang dkk (2003) di Jepang telah membuktikan bahwa pemberian ekstrak kering dari *Hibiscus sabdariffa* L 0.5- 1 % pada diet dapat menghambat terjadinya aterosklerosis dengan menurunkan kadar kolesterol, LDL, trigliserid dan menghambat pembentukan *foam cell* serta mencegah migrasi sel otot polos dan kalsifikasi pembuluh darah pada kelinci. Diduga ekstrak kering *H. sabdariffa* L mempunyai aktifitas antioksidan yang dapat mencegah terjadinya atherosklerosis.

Senyawa bioaktif utama yang berperan sebagai antioksidan adalah *protocatechuic acid* (PCA) dan *antocyanin* serta *asam askorbat*. Selain merupakan antioksidan yang baik, *Hibiscus sabdariffa* Linn juga dianggap aman. Pemberian ekstrak Rosella 150 sampai 180 miligram/KgBB/hari peroral tidak menunjukkan tanda-tanda efek tambahan sedangkan dosis pemberian PCA pada sel kultur hepatosit adalah 0.05 mg/ml, 0.10 mg/ml dan 0.20 mg/ml. Dosis yang dianjurkan untuk minuman teh adalah 1.5 gram/hari dilarutkan dalam air. *Hibiscus sabdariffa* Linn dapat menangkap ROS dan radikal bebas, menurunkan O_2 reaktif, metabolisme peroksidasi lemak menjadi produk non radikal, dan mencegah generasi radikal bebas sehingga melindungi jantung dengan netralisasi radikal bebas sampai 44 % namun mekanisme kerja dari teh rosella merah pada penghambatan atherogenesis belum banyak diketahui.

Melihat patomekanisme aterosklerosis, *Ox-LDL* merupakan salah satu penyebab utama proses atherogenesis diantaranya melalui pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS), menyebabkan aktivasi $NF-\kappa B$. $NF-\kappa B$ merangsang banyak sekali protein/gen antara lain molekul adesi ICAM-1 dan sitokin $TNF-\alpha$ yang dapat memicu timbul dan berkembangnya aterosklerosis sehingga dapat menyebabkan serangan jantung mendadak (infark miokard) akibat pembuntuan arteri koroner sebagai komplikasi klinik dari aterosklerosis. Bunga Rosella merah diduga mempunyai efek pada jalur ini, namun hal ini perlu dibuktikan berikut dosis pemberiannya pada sel endotel. Hipotesis penelitian ini adalah ekstrak bunga Rosella Merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) dengan dosis yang tepat mempunyai efek penghambatan terhadap aktivasi $NF-\kappa B$ dan ekspresi protein $TNF-\alpha$ dan ICAM-1 yang diinduksi oleh paparan *Ox-LDL* pada sebuah model kultur sel endotel vena umbilikal manusia (HUVECs). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dosis yang tepat dari ekstrak bunga Rosella Merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) dan LDL teroksidasi pada kultur sel endothel untuk menginduksi aktivasi $NF-\kappa B$ dan ekspresi protein $TNF-\alpha$ dan ICAM-1.

METODE PENELITIAN

Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true eksperimental*) secara invitro dengan menggunakan HUVECs sebagai model.

Cara Pengambilan Umbilikus

Umbilikus diambil melalui persalinan spontan dengan dua duk atau melalui persalinan caesar, dengan kriteria inklusi adalah kehamilan fisiologis. Sedang eksklusinya adalah kehamilan dengan preeklampsia/eklamsia, kehamilan dengan infeksi, kehamilan dengan hipertensi dan kehamilan dengan diabetes melitus.

- a. Pengerjaan kultur sel endotel tidak melebihi 12 jam setelah waktu kelahiran
- b. Disiapkan botol berisi cord solution dari refrigerator (suhu 4 °C).
- c. Segera setelah kelahiran, umbilikus dipotong sepanjang ± 20 cm dan langsung dimasukkan larutan cord solution

Isolasi dan Pembuatan Kultur Sel Endotel (HUVECs)

Umbilikus dicuci PBSa yang bebas kalsium sampai bersih. Selanjutnya dilakukan isolasi enzim kolagenase 6-7 menit pada 37°C dan dicuci dengan PBSa. Disentrifuge pada kecepatan 1000 rpm selama 8 menit. Supernatan/bagian atas dibuang, precipitatnya merupakan sel endotel dan ditambahkan medium 20 % NBS. Kemudian didispersi dan ditanam dalam plate. Diinkubasi selama 30 menit. Dicuci medium dasar. Ditambahkan medium kultur (RPMI+ NBS 20%). Dinkubasi selama 3-4 hari sampai kultur sel endotel confluent dan monolayer

Pemberian Ekstrak Bunga Rosella Merah Merujuk Lopez (2003)

Kultur primer sel endotel yang telah monolayer diinkubasi dengan atau tanpa ekstrak Bunga Rosella Merah selama 2 jam dengan dosis 0.2 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.005 mg/ml dan 0.001 mg/ml kemudian ditambahkan Ox-LDL dengan dosis 40 mg/ml dan 50 mg/ml 30 menit kemudian langsung diamati pengaruhnya terhadap aktivasi NF- κ B.

Cara Ekstraksi Bunga Rosella Merah

Bunga Rosella merah yang telah dikeringkan dan dihilangkan bijinya diblender. Ditimbang menggunakan timbangan analitik sebanyak 250 gram. Dimasukkan corong pisah yang telah diberi kertas saring pada ujungnya. Ditambahkan etanol absolut 2 (dua) liter (1:4). Disekker 4-6 jam. Didiamkan

selamasemalam sampai \pm daya tampung 1 labu (\pm 12 jam).Diambil fraksi terlarut. Diulangi disekker dan inkubasi semalam sampai larutan jernih. Diambil fraksi terlarut. Hasil ekstraksi dievaporasi.

Cara Pemeriksaan Aktifasi NF- κ B, ekspresi TNF- α dan ICAM-1 merujuk pada Calara, Federico (2000) secara imunohistokimia

Biakan sel dicuci dengan PBS selama 30 menit dan fiksasi dengan methanol selama 5 menit. Kering anginkan dan cuci dengan PBS pH 7,4. Aplikasikan 3% H₂O₂ selama 10 menit dan cuci dengan PBS pH 7,4. Bloking menggunakan serum 5% FBS yang mengandung 0,25% Triton X-100 dan inkubasi selama 1 jam pada suhu ruang. Cuci dengan PBS pH 7,4 dan tetesi dengan monoclonal anti p50/p65, anti TNF- α dan ICAM-1 dan inkubasi semalam. Cuci dengan PBS pH 7,4, tetesi dengan antibodi sekunder berlabel biotin dan inkubasi selama 1 jam. Cuci dengan PBS pH 7,4 dan tetesi dengan SA-HRP (*Strep-Avidin horse radis peroxidase*) selama 40 menit, kemudian cuci dengan PBS pH 7,4 dan aplikasikan cromogen untuk HRP, yaitu DAB (Diamono Benzidine). *Counterstain* dengan Mayer hematoxilen selama 10 menit, bilas dengan air kran dan cuci dengan dH₂O. keringkan dan tutup *coverglass*.

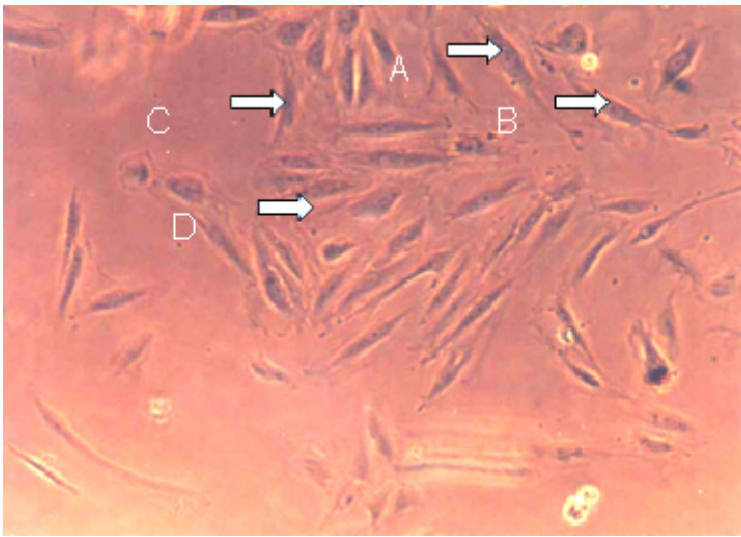
Analisis Data

Data-data yang diperoleh dalam optimalisasi dosis ekstrak bunga Rosella Merah, dosis LDL teroksidasi, pengukuran aktifasi NF- κ B, ekspresi protein TNF- α , dan ekspresi protein ICAM-1 dari setiap perlakuan diolah dan dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan Kultur Sel Endotel Vena Umbilikal Manusia (HUVECs)

Sel endotel diisolasi dari vena umbilikal manusia, dari tali pusat (plasenta) bayi. Pada plasenta, oksigen justru dibawa dan didistribusikan oleh vena pembuluh darah bukan arteri pembuluh darah. Metode isolasi dan kultur HUVECs menggunakan metode standar/baku yang biasa dipergunakan dalam penelitian-penelitian sebelumnya. Hasil kultur sel endotel Vena Umbilikal Manusia (HUVECs) ditunjukkan pada gambar 1 dibawah ini :



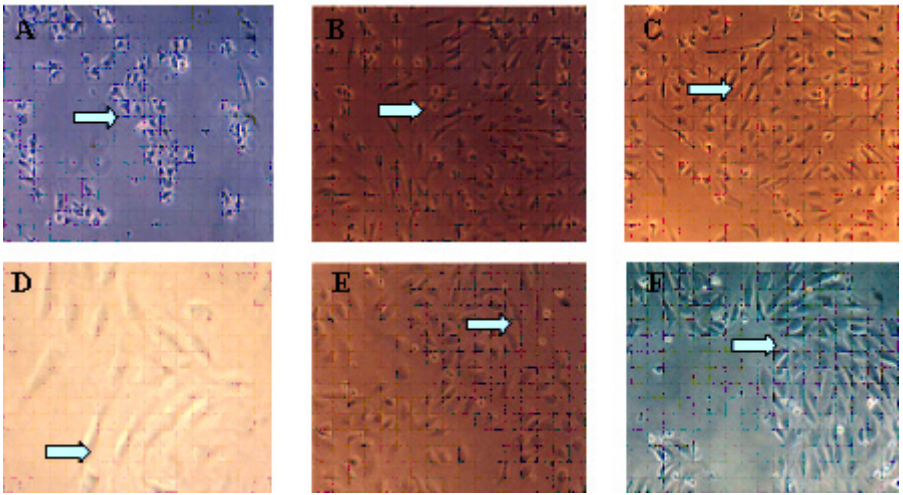
Keterangan : A. Inti sel; B. Sitoplasma; C. Membran plasma;
D. EkstraCeluler Matrik (ECM)

Gambar 1. Morfologi Sel Endotel Vena Umbilikalisis Manusia Primer Normal Hari Ke-4 kultur, diambil dengan Mikroskop Inverted Merk Nikkon dengan Perbesaran 400x

Menurut Arjita dkk (2002), ciri-ciri sel endotel normal secara morfologis adalah bentuk sel endotel *cobblestone* dengan ciri spesifik sel pada bagian tengah tampak bulat dan terang (menyala), bentuk sel pipih dengan jarak antara sel yang teratur dan rapat, permukaan sel mulus ditandai dengan penampakan inti, membran plasma, sitoplasma, extra celluler matriks (ECM) dan tidak terdapat sel yang apoptosis serta monolayer primer.

Optimalisasi Dosis Ekstrak Bunga Rosella Merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn)

Optimalisasi dosis ekstrak bunga Rosella Merah bertujuan untuk melihat toksisitas ekstrak kasar pada sel endotel dan mendapatkan dosis ekstrak yang tepat dalam menghambat aktivasi NF- κ B, ekspresi protein TNF- α dan ekspresi protein ICAM-1. Dosis yang dipergunakan dalam optimalisasi dosis ekstrak adalah 0.2 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.005 mg/ml dan 0.001 mg/ml.



Keterangan : A. 0.2 mg/ml, semua sel mati; B.0.1 mg/m, sebagian besar sel shrinkage dan floating; C.0.05 mg/ml, semua sel shrinkage; D. 0.01 mg/ml, semua sel hidup; E. 0.005 mg/ml, semua sel hidup; F. 0.001 mg/m, semua sel hidup.

Gambar 2. Sel Endotel Vena Umbilikalis Manusia Primer Normal Hari Ke-4 kultur, Setelah Dipapar dengan Ekstrak Bunga Rosella Merah Selama 2 Jam, Diambil dengan Mikroskop Inverted Merk Nikon dengan Perbesaran 400x.

Sel endotel yang diinkubasi dengan ekstrak teh rosella merah dosis tinggi (0.2 mg/ml) selama 2 (dua) jammengalami kematian (apoptosis) dan sel lepas (mengambang) pada medium serta banyak terdapat daerah yang kosong. Hal ini menunjukkan bahwa dosis ekstrak 0.2 mg/ml toksik bagi sel endotel demikian pula untuk dosis 0.1 mg/ml, dan 0.5 mg/ml. Sel endotel yang diinkubasi dengan ekstrak dosis 0.1 mg/ml, dan 0.5 mg/ml sebagian besar sel nampak mulai mengembung (membesar), mulai ada sel *srinkage* (mengkerut), jarak antar sel melebar, meskipun masih terdapat sebagian sel hidup namun setelah sel dipapar dengan LDL teroksidasi selama 30 menit sel mengalami kematian. Sedangkan inkubasi sel endotel dengan ekstrak teh dosis 0.01 mg/ml, 0.005 mg/ml dan 0.001 mg/ml terlihat sel hidup.

Berdasarkan gambar 2 diatas, dosis dari ekstrak bunga rosella Merah yang aman bagi sel endothel adalah 0.01 mg/ml, 0.005 mg/ml dan 0.001 mg/ml.

Optimalisasi Kadar LDL Teroksidasi (Ox-LDL)

Optimalisasi kadar LDL Teroksidasi (Ox-LDL) bertujuan untuk melihat toksisitas LDL teroksidasi (Ox-LDL) pada sel endotel dan mendapatkan kadar LDL teroksidasi (Ox-LDL) yang tepat dalam meningkatkan aktivasi NF- κ B, ekspresi protein TNF- α dan ekspresi protein ICAM-1. Berdasarkan Cominacini, et. al. (2000), kadar LDL teroksidasi (Ox-LDL) antara 10-50 μ g/ml mampu menyebabkan stres oksidatif pada sel endotel dan selanjutnya dapat mengaktifasi NF- κ B. Penelitian baru dari Sianne & Agus (2005), LDL teroksidasi (Ox-LDL) dengan kadar 50 μ g/ml mampu mengaktifasi NF- κ B dan meningkatkan ekspresi protein TNF- α serta ICAM-1, disamping itu Ox-LDL pada kadar tersebut tidak toksik bagi sel endotel sehingga yang digunakan dalam penelitian ini adalah 50 μ g/ml dan 40 μ g/ml.

Hasil pengukuran aktivasi NF- κ B, ekspresi protein TNF- α dan ekspresi protein ICAM-1 pada berbagai perlakuan dengan kadar Ox-LDL 50 μ g/ml dan 40 μ g/ml secara lengkap dapat dilihat pada tabel 1 dibawah ini :

Tabel 1. Hasil Pengukuran Aktivasi NF- κ B, Ekspresi Protein TNF- α dan Ekspresi Protein ICAM-1 pada Berbagai Perlakuan dengan Kadar OX-LDL 50 μ g/ml dan 40 μ g/ml

Perlakuan	Variabel Pengukuran (X \pm SD)%					
	Kadar Ox-LDL 50 μ g/ml			Kadar Ox-LDL 40 μ g/ml		
	Aktivasi NF- κ B	Ekspresi Protein TNF- α	Ekspresi Protein ICAM-1	Aktivasi NF- κ B	Ekspresi Protein TNF- α	Ekspresi Protein ICAM-1
Kontrol negatif	2.19 \pm 5.79	0.00 \pm 0.00 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a	2.21 \pm 7.28	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
Kontrol positif	36.54 \pm 29.30	2.87 \pm 5.70	56.64 \pm 41.42	48.40 \pm 17.84	40.28 \pm 16.81	96.17 \pm 12.39
Dosis 0.001 mg/ml	6.03 \pm 6.73	1.42 \pm 6.39	15.03 \pm 20.62	1.70 \pm 4.2	4.05 \pm 8.72	7.32 \pm 13.53
Dosis 0.005 mg/ml	5.17 \pm 7.24	0.83 \pm 3.73	0.56 \pm 2.48	0.73 \pm 2.39	2.09 \pm 6.56	1.97 \pm 5.46
Dosis 0.01 mg/ml	1.88 \pm 4.08	Sel mati	Sel mati	0.00 \pm 0.00	1.67 \pm 7.45	0.71 \pm 3.19

Dari tabel diatas menunjukkan bahwa kadar LDL teroksidasi (Ox-LDL) 50 $\mu\text{g/ml}$ bersifat toksik bagi sel endotel ditandai dengan kematian sel endotel yang sebelumnya diinkubasi dengan ekstrak teh dosis tertinggi (0.01 mg/ml) sedangkan pada kadar 40 $\mu\text{g/ml}$ sel nampak hidup. Di samping itu, dengan pemberian LDL teroksidasi sebesar 40 $\mu\text{g/ml}$ dapat menginduksi terjadinya aktivasi NF- $\kappa\beta$, ekspresi protein TNF- α dan ekspresi protein ICAM-1 lebih besar dibandingkan kadar 50 $\mu\text{g/ml}$.

Dari data diatas, disimpulkan bahwa untuk melihat efek pemberian ekstrak teh Rosella merah terhadap aktivasi NF- $\kappa\beta$ dan ekspresi protein TNF- α serta ICAM-1 digunakan kadar Ox-LDL 40 $\mu\text{g/ml}$.

SIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil analisis dapat disimpulkan bahwa dosis yang tepat dan aman dari ekstrak bunga Rosella Merah untuk kultur sel endothel vena umbilikalis manusia adalah dosis 0.01 mg/ml, 0.005 mg/ml dan 0.001 mg/ml. Sedangkan dosis yang tepat dari LDL teroksidasi untuk mengaktifasi NF- $\kappa\beta$, ekspresi protein TNF- α dan ekspresi protein ICAM-1 serta tidak bersifat toksik bagi sel endothel adalah 40 $\mu\text{g/ml}$.

Disarankan agar dilakukan penelitian lanjutan yang serupa dengan analisis analitik untuk melihat perbedaan antar perlakuan sehingga bisa ditetapkan dosis dari ekstrak bunga Rosella Merah yang paling tepat dan bermakna.

PERSANTUNAN

Selama penelitian ini, penulis banyak mendapat bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, dalam kesempatan ini tidak lupa penulis mengucapkan terima kasih kepada: 1). Prof. DR. H. Djanggan Sargowo, Dr., SpPD., SpJP(K) yang banyak memberikan masukan berharga yang membuka wawasan pemikiran ilmiah dari penulis, 2). Dr. M. Saifur Rohman, Ph.D, yang banyak membantu dalam pengambilan dan pengumpulan data, 3). Ruli Sudaryanto, SST yang telah memotivasi dan memberi dukungan, 4). Semua pihak yang telah membantu dalam penelitian ini, yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

DAFTAR PUSTAKA

- Arjita et al. 2002. *Pengaruh Kadar Glukosa Tinggi Terhadap Sintesa Nitrix Oxide Dari Huvecs Culture Dengan Teknik Bioassay*. Biosain, Volume 2 No 1 April.
- Calara, Federico. 2000. *An Animal Model To Study Local Oxidation Of LDL And Its Biological Effect In The Arterial Wall*. Arteriosclerosis, Thrombosis And Vascular Biology, Volume 18, p 884-893.
- Chang-che chew, et al. 2003. *Hibiscus Sabdariffa Extract Inhibits The Development Atherosclerosis In Cholesterol-Fed Rabbit*. Journal Of Agricultural And Food Chemistry.
- Collins, Tucker, Cybulsky, Myron I. 2001. *NF- κ B : Pitoval Mediator Or Innocent Bystander In Atherogenesis ?*. The Journal Of Clinical Investigation, Volume 107, Number 3, P. 255-263.
- Cominacini, Luciano., et.al. 2000. *Oxidied Low Density Lipoprotein (Ox-LDL) Binding To Ox-Ldl Receptor-1 In Endothelial Cells Induces The Activation Of NF-K α Through An Increased Production Of Intracelluler Reactive Oxigyen Species*. The Journal Of Biological Chemistry, Volume 275, no 17, p 12633-12638.
- Duke, James A. 1998. *Handbook Of Energy Crops : Hibiscus Sabdariffa Linn, Malvacea, Roselle*. Center For New Crops And Plants Products, Purduc University.
- Krause, Brian R., et.al. 2002. *Direct Vascular Target For Atherosclerosis Prevention*. Departement Of Cardiovascular Therapeutic, Pfizer Global Research And Development, USA.
- Lopez, Resendiz., et al. 2003. *Antimutagenicity Of Natural Phenolic Compounds In Dried Flowers From Hibiscus Sabdariffa Linn*.
- Ross, Russell. 1999. *Atherosclerosis-An Inflammatory Disease*. N. Eng J Med, Volume 340, p 115-126.
- Sianne ., Agus. 2005. *Efek Penghambatan Green Tea Terhadap Akatifasi NF-KB*. Tesis PPDS Unibraw Malang.
- Tjokroprawiro, A. 1997. *Diabetes Up Date 1997 Dalam : Proceedings Of The Third Surabaya Diabetes Up Data*, Surabaya : p 1-21.