

# EFEK PENGHAMBATAN BUNGA ROSELLA MERAH (*Hibiscus sabdariffa* Linn) SEBAGAI ANTI ATEROSKLEROSIS TERHADAP AKTIFASI NF- $\kappa$ B PADA KULTUR SEL ENDOTHEL YANG DIPAPAR LOW DENSITY LIPOPROTEIN TEROKSIDASI

Dyah Widowati dan Dwi Sarbini

Jurusan Gizi Fakultas Ilmu Kesehatan  
Universitas Muhammadiyah Surakarta  
Jl. A.Yani Tromol Pos 1 Pabelan, Surakarta 57102  
Telp. (0271) 717417, Fax. (0271) 715448

## ABSTRAK

**P**enyakit atherosclerosis telah menjadi ancaman global akhir-akhir ini. Dengan memperhatikan patomekanisme atherosclerosis, Ox-LDL adalah salah satu sumber utama proses aterogenesis melalui pembentukan ROS yang antara lain akan mengaktivasi NF- $\kappa$ B dan menyebabkan terjadinya inflamasi dalam penyakit atherosclerosis, Rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) dianggap mempunyai pengaruh pada jalur ini, namun masih perlu dibuktikan bersama-sama dengan dosisnya. Penelitian-penelitian terakhir menunjukkan bahwa Rosella adalah suatu tumbuhan tropis yang mengandung antioksidan, yaitu senyawa polifenol (asam protocatechuic dan antocyanin) dan asam askorbat secara *in vitro* dan *in vivo*, dan ditemukan secara luas di Indonesia. Mekanisme kerja bunga merah ini terhadap penghambatan aterogenesis sebagian besar telah belum diketahui. Penelitian ini bertujuan untuk meneliti apakah ekstrak bunga Rosella merah menghambat aktivasi NF- $\kappa$ B yang memediasi terjadinya inflamasi pada atherosclerosis dengan menggunakan HUVEC yang diberi perlakuan dengan Ox-LDL. Sel endotelial yang dikulturkan (HUVECs) digunakan untuk model sel-sel endotelial. Pada 5 kelompok yang diberi perlakuan, yaitu kelompok kultur HUVECs tanpa penyajian Ox-LDL sebagai control negative; kelompok dengan penyajian Ox-LDL 40 ug/ml (dosis menurut riset eksploratori) sebagai kelompok positif; kelompok-kelompok yang diberi ekstrak bunga Rosella dengan berbagai macam dosis (0,001 mg/ml, 0,005 mg/ml dan 0,01 mg/ml) kemudian Ox-LDL diberikan. 40 ug/ml Ox-LDL diperlakukan pada HUVECs untuk menstimulasi respon-respon sel endotelial yang meniru kondisi dyslipidemia. Bunga Rosella merah dalam berbagai macam dosis, dan suatu pembawa untuk control, diberikan 2 jam sebelum perlakuan dengan Ox-LDL. Aktivasi NF- $\kappa$ B diukur dengan immunohistochemistry. Perlakuan bunga Rosella merah pada HUVECs yang diberi perlakuan dengan Ox-LDL, dalam dosis yang memadai, dapat menghasilkan pencegahan aktivasi NF- $\kappa$ B dalam merespon terhadap perlakuan Ox-LDL, adalah dosis 0,001 mg/ml, 0,005 mg/ml dan 0,01 mg/ml. Menurut korelasi Spearman ( $p=0,01$ , koefisien korelasi=-1), ada korelasi negative antara aktivasi NF- $\kappa$ B dalam kelompok control positif dengan kelompok-kelompok yang diberi ekstrak the Rosella merah dalam berbagai macam dosis. Penelitian ini dapat memberikan manfaat untuk pencegahan dan pengobatan perkembangan penyakit atherosclerosis di masa depan, khususnya penghambatan aktivasi NF- $\kappa$ B. Bunga Rosella merah kering 0,001 mg/ml atau kelopak kering 0,048 gram dapat digunakan untuk konsumsi diet.

**Kata Kunci:** Atherosclerosis, LDL yang dioksidasi, bunga Rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn), aktivasi NF- $\kappa$ B

## 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- $\kappa$ B and 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 flower on the atherogenesis inhibition has not been largely known. This study aimed to investigate whether Red Rosella Flower extract inhibit NF- $\kappa$ B activation that mediated the occurrence of inflammation on atherosclerosis by using Ox-LDL-treated HUVECs. Cultured endothelial cell (HUVECs), is used for a model of endothelial cells. On 5 treated groups, that was the group of HUVECs culture without presenting Ox-LDL as negative control; groups with 40 ug/ml Ox-LDL presentation (dosage was according to exploratory research) as positive control; groups given the Rosella flower abstract with various dosages (0.001 mg/ml, 0.005 mg/ml and 0.01 mg/ml) then being presented Ox-LDL. 40 ug/ml of Ox-LDL is treated on HUVECs to stimulate responds of endothelial cells mimicking dyslipidemia condition. The Red Rosella flower in a various dose, and a vehicle for control, were given 2 h before Ox-LDL treatment. The NF- $\kappa$ B activation measured by immunohistochemistry. The red rosella flower treatment on Ox-LDL-treated HUVECs, in adequate dose, may result in prevention NF- $\kappa$ B activation of in respond to Ox-LDL treatment, is (0.001 mg/ml, 0.005 mg/ml and 0.01 mg/ml) dosages. By correlation Spearman's ( $p=0.01$ , Correlation Coeff= -1), there is negative correlation between NF- $\kappa$ B activation in positive control groups and groups given the Red Rosella tea extract with various dosages. This study may contribute a benefit for prevention and medication for atherosclerosis disease progression in the future, particularly inhibition of NF- $\kappa$ B activation. The red Rosella flower with 0.001 mg/ml or 0.048 g dried calyx can use consumption of diet.

**Keywords:** Atherosclerosis, Oxidized-LDL, Red Rosella Flower (*Hibiscus sabdariffa* Linn), NF- $\kappa$ B activation

## 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 (Tjokprawiro, 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- $\kappa$ B). NF- $\kappa$ B yang teraktivasi akan menginduksi terbentuknya

protein-protein sistim 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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, Pilipina, 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 arterosklerosis 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 aktioksidan yang dapat mencegah terjadinya atherosklerosis.

Senyawa bioaktif utama yang berperan sebagai antioksidan adalah *protocatechuic acid* (PCA) dan *antocyanin* serta *asam askorbat*. Selain merupakan anti oksidan 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<sub>2</sub> 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 penye-

bab 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 yang diinduksi oleh paparan Ox-LDL pada sebuah model kultur sel endotel vena umbilikal manusia (HUVECs). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek dari ekstrak bunga Rosella Merah (*Hibiscus sabdariffa Linn*) terhadap penghambatan aktivasi NF- $\kappa$ B.

## METODE PENELITIAN

### Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental*) 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. Sedangkan eksklusinya adalah kehamilan dengan preeklampsia/eklampsia, kehamilan dengan infeksi, kehamilan dengan hipertensi dan kehamilan dengan diabetes melitus.

a. Pengerjaan kultur sel endotel tidak

- melebihi 12 jam setelah waktu kelahiran
- Disiapkan botol berisi cord solution dari refrigerator (suhu 4 °C).
  - Segera setelah kelahiran, umbilikus dipotong sepanjang  $\pm$  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. Di inkubasi 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- $\kappa$ 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 selama semalam sampai  $\pm$  daya



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.

### **Pengukuran Aktifasi NF- Secara Imunohistokimia**

Hasil kultur sel endotel Vena Umbilikalis Manusia (HUVECs) yang telah dipapar ekstrak bunga rosella merah selama 2 (dua) jam dan selanjutnya dipapar Ox-LDL.

Dari gambar 2 dapat dilihat bahwa sel endotel Vena Umbilikalis Manusia (HUVECs) yang telah dipapar ekstrak bunga rosella merah selama 2 (dua) jam dan selanjutnya dipapar Ox-LDL selama 30 menit dalam keadaan hidup ditandai dengan 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. Sel tersebut selanjutnya dilakukan pengecatan imunohistokimia dengan hasil seperti gambar 3.

Gambar 2. Sel Endotel Vena Umbilikalis Manusia Setelah Diinkubasi Ekstrak Bunga Merah Selama 2 Jam Dan Dipapar LDL Teroksidasi Selama 30 Menit Sebelum dilakukan pengecatan imunohistokimia, diambil dengan mikroskop inverted merk nikon dengan perbesaran 400x.

Keterangan :Semua sel dalam keadaan hidup. A. Sel Endotel normal (kontrol negatif); B.Sel endotel yang dipapar Ox-LDL 40  $\mu$ g/ml (kontrol positif); C. Sel endotel yang dipapar ekstrak bunga dosis 0.001 mg/ml; D. Sel endotel yang dipapar ekstrak bunga dosis 0.005 mg/ml; E. Sel endotel yang dipapar ekstrak bunga dosis 0.01 mg/ml.

Gambar 3. Hasil Sediaan Sel endotel dengan Pengecatan Imunohistokimia untuk melihat Aktifasi NF- $\kappa$ B, diambil dengan mikroskop Olympus cx21 dengan perbesaran 1000x.

Keterangan :

A. Sel Endotel normal (kontrol negatif), tidak terdapat aktivasi NF- $\kappa$ B dengan inti sel biru terang ; B. Sel endotel yang dipapar Ox-LDL 40  $\mu$ g/ml (kontrol positif), NF- $\kappa$ B banyak teraktivasi dengan inti sel lebih pucat dan tipis; C. Sel endotel yang dipapar ekstrak bunga dosis 0.001 mg/ml, terjadi penurunan aktivasi NF- $\kappa$ B dengan inti sel lebih biru; D. Sel endotel yang dipapar ekstrak bunga dosis 0.005 mg/ml, terjadi penurunan aktivasi NF- $\kappa$ B lebih banyak dengan inti sel lebih biru terang; E. Sel endotel yang dipapar ekstrak bunga dosis 0.01 mg/ml, tidak terjadi NF- $\kappa$ B dengan inti sel lebih biru dan terang. Panah merah = positif aktivasi NF- $\kappa$ B, panah biru = negatif aktivasi NF- $\kappa$ B.

Dari gambar diatas, dapat dilihat bahwa sediaan sel endotel Vena Umbilikal Manusia (HUVECs) pada kelompok kontrol positif (yang diberi ox-LDL) terjadi aktivasi NF- $\kappa$ B ditandai dengan inti sel berwarna coklat (kecoklatan) atau warna inti sel lebih tipis dan pudar serta pucat. Hal tersebut disebabkan oleh adanya protein p50 yang diinti lebih banyak daripada yang ada di dalam sitoplasma. Dari gambar tersebut dapat dilihat pula bahwa semakin tinggi pemberian dosis ekstrak bunga Rosella merah, inti sel semakin terlihat

ngga menunjukkan  
nambah dosis ekstrak  
dan berkurang jumlah  
ukuran aktivasi NF- $\kappa$ B  
pada pemberian LDL  
) pada kelompok  
( $\pm 17.84$ ) mening-  
NF- $\kappa$ B 22 kali lipat  
dibanding kelompok normal ( $2.21 \pm 7.28$ ).  
Jumlah NF- $\kappa$ B yang teraktivasi pada  
kelompok perlakuan yang diberikan ekstrak  
bunga rosella Merah dengan berbagai dosis

Tabel1. Efek Pemberian Ekstrak Bunga Rosella Merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) Terhadap Aktifasi NF-

Data adalah rerata  $\pm$  SD.

Berdasarkan analisis statistik Duncan ( $p < 0.01$ ), perbedaan notasi huruf menunjukkan terdapat perbedaan nyata.

yaitu 0.001 mg/ml, 0.005 mg/ml dan 0.01 mg/ml menurun secara bermakna ( $p < 0.01$ ) aktifasi NF- $\kappa$ B berturut-turut 46.7 %, 47.67%, 48.4 % dibanding pada kelompok yang tidak diberikan ekstrak bunga rosella merah (kontrol positif) yang secara jelas dapat dilihat pada tabel 1 dan gambar 4.

Dari gambar diatas, jumlah aktifasi NF- tertinggi terjadi pada kelompok perlakuan yang diberikan Ox-LDL (kontrol positif) dan terendah pada kelompok yang diberi ekstrak bunga rosella merah dengan dosis terbesar (0.01 mg/ml).

Berdasarkan analisis statistik *One Way Anova* yang dilanjutkan dengan uji "beda kelompok" *Duncan*, terdapat pengaruh ekstrak bunga rosella merah yang signifikan terhadap jumlah aktifasi NF- ( $p < 0.01$ ). Jumlah aktifasi NF- menunjukkan terdapat perbedaan nyata pada kelompok kontrol negatif dan kelompok kontrol positif ( $p < 0.01$ ). Pemberian ekstrak bunga Rosella Merah pada berbagai dosis yaitu 0.001 mg/ml, 0.005 mg/ml dan 0.01 mg/ml berbeda nyata dengan kelompok kontrol positif yang tidak diberikan ekstrak bunga Rosella Merah, namun

antar dosis ekstrak bunga Rosella Merah yaitu dosis 0.001 mg/ml, 0.005 mg/ml dan 0.01 mg/ml tidak menunjukkan beda nyata.

Berdasarkan analisa statistik korelasi non parametrik menggunakan *Spearman's* ( $p < 0.01$ ), didapatkan bahwa terdapat hubungan negatif antara jumlah aktifasi NF- pada kelompok kontrol positif dengan jumlah aktifasi NF- pada kelompok yang diberikan ekstrak bunga dengan berbagai dosis dengan koefisien korelasi -1. Hal ini menunjukkan bahwa semakin besar pemberian dosis ekstrak bunga rosella merah pada sel endotel yang telah dipapar Ox-LDL semakin kecil jumlah aktifasi NF- .

#### **Efek Ekstrak Bunga Rosella Merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) Terhadap Aktifasi NF-**

Efek dan kerja suatu senyawa dipengaruhi oleh beberapa faktor, termasuk faktor farmakokinetik dan farmakodinamik yang berbeda-beda untuk tiap jenis senyawa (Arini, 1995). Ekstrak kasar didapatkan dengan cara merendam suatu bahan dengan satu macam pelarut sehingga zat terlarut di dalamnya bermacam-macam dan

tidak spesifik. Hal ini menyebabkan kesulitan dalam memprediksikan dosis, kemampuan dan mekanisme kerjanya. Untuk itu dilakukan optimalisasi dosis ekstrak untuk mengetahui toksisitas ekstrak kasarnya terhadap sel endotel sehingga dapat diperkirakan dosis optimalnya. Untuk mengetahui kemampuan antioksidan dan mekanisme kerjanya sebagai pedoman peneliti mengacu pada senyawa bioaktif yang diduga berperan sebagai antioksidan pada kelopak bunga *Hibiscus sabdariffa* Linn, yaitu senyawa phenolik (phenolic compound) terutama flavonoid jenis antosianin dan protocatechuic acid serta kandungan vitamin C-nya.

Dari pengukuran aktivasi NF- $\kappa$ B dan analisis ANOVA ( $p < 0.01$ ), didapatkan bahwa terdapat pengaruh pemberian ekstrak bunga Rosella merah terhadap penghambatan aktivasi NF- $\kappa$ B secara bermakna. Jumlah aktivasi NF- $\kappa$ B pada kelompok kontrol positif (dipapar Ox-LDL) lebih tinggi signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa ox-LDL akan menyebabkan meningkatnya Reactive Oxygen Species (ROS) yang mengakibatkan teraktivasinya NF- $\kappa$ B. Apabila dibandingkan dengan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak bunga rosella merah, jumlah aktivasi NF- $\kappa$ B kelompok kontrol positif lebih tinggi secara signifikan. Penelitian ini mendukung penelitian Tseng et al. (1996) bahwa ekstrak teh rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) mempunyai aktifitas antioksidan. Diduga zat bioaktif yang mempunyai aktifitas antioksidan dan berperan dalam menghambat aktivasi NF- $\kappa$ B adalah senyawa penolik terutama protocatechuic acid dan flavonoid-antosianin (Jamie & Schmitt, 2000; Ranzio B, 2002). Dijelaskan pula bahwa protocatechuic acid dapat mencegah terlepasnya ikatan p50 dan p65

sehingga tidak terjadi translokasi p50/p65 ke dalam nukleus dan sebagai inhibitor NADPH oxidase yang menghasilkan radikal superoksid anion. Oleh Ho, Emily (2002) dikemukakan bahwa efek penghambatan antioksidan pada aktivasi NF- $\kappa$ B telah dibuktikan melalui penghambatan degradasi I $\kappa$ B, penghambatan aktivasi enzim kinase I $\kappa$ B sehingga tidak terjadi fosforilasi akibatnya dimer NF- $\kappa$ B (p50 dan p65) tidak terlepas dan selanjutnya tidak terjadi translokasi p50 dan p65 ke dalam nukleus. Dijelaskan juga bahwa efek penghambatan antioksidan terhadap aktivasi NF- $\kappa$ B melalui penghambatan ikatan pada gen target (*DNA binding domain*). Hal ini diperkuat oleh Stache et al. (2002) bahwa PCA terbukti mempunyai kemampuan dalam menghambat aktivasi NF- $\kappa$ B melalui penghambatan degradasi I $\kappa$ B pada HUVECs. Lee, et al. (2002) menjelaskan bahwa aktifitas antioksidan yang dimiliki PCA dalam menghambat oksidasi LDL lebih tinggi dibandingkan vitamin C melalui penghambatan degradasi kolesterol dan fragmentasi apo B.

Selain PCA, dilaporkan kandungan flavonoid-anthocyanin (*Hibiscus anthocyanins-HAs*) pada bunga rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) mempunyai aktifitas antioksidan dalam sistem liposomal (Farombi, 2003). Dibuktikan Tseng, et al. (1997) aktifitas Hibiscus anthocyanins (HAs) sebagai antioksidan dalam sistem liposomal adalah menangkap radikal bebas 1.1 diphenyl 1-2 picrylhydrazide (DPPH), menurunkan ikatan LDH (lactate dehydrogenase), menurunkan pembentukan MDA (malondialdehyde), dan menurunkan kerusakan oksidatif. Sedangkan menurut Jonadet et al. (1990), kandungan anthocyanin dan flavon dalam ekstrak kasar calyc Rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) secara hidroalkoholik pada in vivo

terbukti sebagai angio protektif. Penelitian lain membuktikan bahwa antosianin dalam ekstrak kering kelopak Rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) mampu menghambat stress oksidatif (Ali, et al., 2003) yang menginduksi aktivasi NF- $\kappa$ B. Hal ini dipertegas oleh Ronzio (2002) dan Mazza & Miniati (2000) bahwa anthocyanin dan flavonoid telah terbukti dapat menghambat LDL oksidasi dan menghambat aktivasi NF- $\kappa$ B serta menurunkan inflamasi. Menurut Disilventro (2000), mekanisme kerja antosianin dan flavone dalam menghambat Ox-LDL adalah dengan melawan radikal bebas, menghilangkan produk oksidan, menghambat oksidasi lipid, lipoprotein, liposom dan DNA serta menekan produksi radikal dan prekursornya baik secara in vivo dan in vitro. Disamping itu, flavonoid-anthocyanin dapat meningkatkan produksi antioksidan endogen (Superoksid Dismutase, Gluthation Peroxidase dan Catalase). Banyak peneliti lain mengungkapkan bahwa flavonoid bersifat antioksidan sehingga dapat menghambat oksidasi LDL pada dinding pembuluh koroner, menghambat platelet yang berperan pada aterosklerosis, menghambat pembelahan sel otot polos pembuluh darah, memperbaiki fungsi endotel, dan menghambat ekspresi Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1).

Aktifitas biologi dari anthocyanin (bioflavonoid), salah satunya adalah meningkatkan efektifitas kerja dari vitamin C (Wolinsky dan Hickson, 2000) sehingga meningkatkan aktifitas antioksidan vitamin C. Efek penghambatan bunga Rosella Merah (*Hibiscus sabdariffa* L) terhadap aktivasi NF- $\kappa$ B diduga karena kandungan vitamin C-nya mampu melindungi LDL kolesterol dari kerusakan oksidatif dan mempunyai potensi anti inflamasi sehingga mampu mencegah aterosklerosis (anti-aterosklerotik).

Hal ini sejalan dengan penelitian Collins et al. (2001) bahwa pemberian antioksidan (vitamin C) dapat menurunkan stres oksidatif sehingga dapat menghambat atherogenesis melalui penghambatan oksidasi LDL dan menurunkan produk-produk seluler serta mengurangi ROS pada sel endotel. Melalui mekanisme penghambatan pada oksidasi LDL, aktivasi NF- $\kappa$ B juga dapat dihambat.

Namun berdasarkan analisis beda nyata menggunakan *Duncan*, ternyata antar berbagai dosis pemberian ekstrak bunga Rosella Merah (dosis 0.01 mg/ml, 0.005 mg/ml, 0.001 mg/ml) tidak menunjukkan beda nyata. Hal ini dimungkinkan oleh jarak (*range*) yang diberikan terlalu dekat dan dosis yang terlalu kecil. Dari hasil analisis korelasi *Spearman's* ( $p=0.00$ , *correlation Coef*= -1) didapatkan korelasi negatif dan bermakna antara aktivasi NF- $\kappa$ B dengan pemberian ekstrak bunga Rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn). Hal ini berarti semakin tinggi dosis pemberian ekstrak bunga Rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn), aktivasi NF- $\kappa$ B semakin berkurang. Hal ini disebabkan oleh adanya efek penghambatan dari ekstrak bunga Rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) terhadap aktivasi NF- $\kappa$ B akibat induksi Ox-LDL.

## SIMPULAN

Berdasarkan analisis ANOVA ( $p<0.01$ ), pemberian LDL teroksidasi pada kultur sel endotel mampu meningkatkan aktivasi NF- $\kappa$ B dan pemberian ekstrak bunga Rosella Merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) dengan dosis 0.001 mg/ml, 0.005 mg/ml dan 0.01 mg/ml pada kultur sel endotel yang selanjutnya dipapar LDL teroksidasi dapat menurunkan aktivasi NF- $\kappa$ B.

## UCAPAN TERIMA KASIH

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). Semua pihak yang telah membantu dalam penelitian ini, yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

## DAFTAR PUSTAKA

- Arjita et all.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 all. 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- $\kappa$ B : Pitoval Mediator Or Innocent Bystander In Atherogenesis ?*. The Jounal Of Clinical Investigation, Volume 107, Number 3, P. 255-263.
- Cominacini, Luciano., et.all. 2000. *Oxidied Low Density Lipoprotein (Ox-LDL) Binding To Ox-Ldl Receptor-1 In Endothelial Cells Induces The Activation Of NF-K $\alpha$  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.all. 2002. *Direct Vascular Target For Atherosclerosis Prevention*. Departement Of Cardiovascular Therapeutic, Pfizer Global Research And Development, USA
- Lopez, Resendiz., et all.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