

The Effect Of Red Rosella Tea (*Hibiscus sabdariffa* Linn) on the Inhibition of NF- κ B Activation, TNF- α and ICAM-1- Protein Expressions Following Treatment with Ox-LDL in HUVECs

Dwi Sarbini¹, Djanggan Sargowo², M. Saifur Rohman³

Background. Atherosclerosis disease has been a global threat. Ox-LDL was one of major source of atherogenesis process, through the ROS formation which would then activate NF- κ B and increase the expression of TNF- α and ICAM-1, leading to the occurrence of inflammation. Recent studies indicate that red Rosella tea is a tropical plant containing antioxidant (protocatechuic acid and antocyanin) and ascorbate acid. This tea is widely distributed in Indonesia. The mechanism of action of this tea on the inhibition of atherogenesis has not been largely known. This study aim to investigate the effect and mechanism of the red Rosella tea on the expression of NF- κ B, TNF- α and ICAM-1.

Methods and results. Cultured endothelial cell, HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial), is used for a model of endothelial cells. There are 5 groups: 1) HUVECs culture without Ox-LDL as negative control; 2) HUVECs culture with Ox-LDL as positive control; and 3 groups given various dosages of the red Rosella tea (0.001 mg/ml, 0.005 mg/ml and 0.01 mg/ml) and Ox-LDL. OxLDL (40 mg/ml) is added on HUVECs to stimulate responds of endothelial cells mimicking dyslipidemia condition. The Red Rosella tea were given 2 h before Ox-LDL treatment. The NF- κ B activation, the protein expressions of TNF- α and ICAM-1 are detected by immunohistochemistry.

Treatment with red rosella tea on Ox-LDL-treated HUVECs resulted in prevention of NF- κ B activation which in turn inhibited the increased of TNF- α and ICAM-1 protein expressions. Spearman's correlation analysis showed that there is negative correlations between dosages of red tea with NF- κ B activation, TNF- α and ICAM-1 protein expressions ($p=0.01$, Correlation Coeff= -1).

Conclusions. This study indicates the benefit of red Rosella tea on the prevention and medication for atherosclerosis disease.

(J Kardiol Ind 2007;28:133-141)

Keywords: atherosclerosis, Oxidized-LDL, the red Rosella tea, NF- κ B, TNF- α , ICAM-1

¹Department of Nutrition Health Science Faculty University of Muhammadiyah Surakarta.

² Medical Faculty, Brawijaya University, Malang.

³ Biochemistry Laboratory Medical Faculty, Brawijaya University, Malang.

Efek Ekstrak Teh Rosella Merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) terhadap Penghambatan Aktifasi *NF-κB*, Ekspresi Protein *TNF-α* dan *ICAM-1* pada Biakan *HUVECS* yang Dipapar dengan *Low Density Lipoprotein* Teroksidasi

Dwi Sarbini¹, Djanggan Sargowo², M. Saifur Rohman³

Latar Belakang. Aterosklerosis kini sudah merupakan ancaman global. Ox-LDL adalah salah satu sumber utama proses aterosklerosis, yakni melalui pembentukan ROS (*reactive oxygen species*) yang selanjutnya akan mengaktifasi NF-κB, dan meningkatkan ekspresi TNF-α dan ICAM-1, yang berperan dalam proses inflamasi. Studi akhir-akhir ini membuktikan bahwa, teh Rosella merupakan tanaman tropis yang mengandung antioksidan (*protocatechuic acid dan antocyanin*) serta asam askorbat. Teh ini tersebar luas di Indonesia. Mekanisme kerja teh ini dalam menghambat aterosklerosis belum dipahami benar. Studi ini bertujuan untuk meneliti efek dan mekanisme teh Rosella merah terhadap ekspresi NF-κB, TNF-α dan ICAM-1.

Metoda dan Hasil. Kultur sel endotel, HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial) digunakan untuk model sel endotel. Ada 5 kelompok, yaitu: pertama adalah kelompok kultur Huvec tanpa Ox-LDL sebagai kontrol negatif, kedua adalah kelompok kultur Huvec dengan Ox-LDL sebagai kontrol positif, dan tiga kelompok lainnya yang diberi berbagai dosis the Rosella merah (0.001 mg/ml, 0.005 mg/ml dan 0.01 mg/ml) dan Ox-LDL. Ox-LDL (40 mg/ml) ditambahkan pada Huvec untuk merangsang respons sel endotel menyerupai kondisi dislipidemia. Teh Rosella merah diberikan 2 jam sebelum pemaparan Ox-LDL. Aktivasi NF-κB, ekspresi protein TNF-α dan ICAM-1 dideteksi dengan immunohistokimia. Pemberian ekstrak teh Rosella merah pada HUVEC yang dipapari Ox-LDL dapat mencegah aktivasi NF-κB, yang kemudian menghambat peningkatan ekspresi protein TNF-α and ICAM-1. Analisis korelasi Spearman memperlihatkan adanya korelasi negatif antara dosis teh Rosella merah dengan aktivasi NF-κB, ekspresi protein TNF-α dan ICAM-1 ($p=0.01$, Correlation Coeff= -1).

Kesimpulan. Studi ini membuktikan manfaat teh Rosella merah dalam mencegah dan mengatasi penyakit aterosklerosis.

Kata kunci: aterosklerosis, Oxidized-LDL, teh Rosella merah, NF-κB, TNF-α, ICAM-1

Alamat Korespondensi:

Dwi Sarbini, MSc
Jurusan Gizi, Fakultas Ilmu-Ilmu Kesehatan Universitas
Muhammadiyah Surakarta

Penyakit kardiovaskular menjadi masalah kesehatan di dunia dan di Indonesia dan merupakan penyebab kematian utama di dunia sampai tahun 2020. Penyakit jantung koroner dan pembuntuan pembuluh darah otak diantaranya disebabkan oleh aterosklerosis.¹ Telah dibuktikan bahwa aterosklerosis merupakan proses

inflamasi/keradangan kronis yang salah satunya dipicu oleh modifikasi *Low Density Lipoprotein (LDL)* yang berupa *oxidized LDL*.²

Teh 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. Penelitian di Jepang telah membuktikan bahwa pemberian ekstrak kering dari *Hibiscus sabdariffa* L 0.5- 1 % pada diet dapat menghambat terjadinya aterosklerosis. Diduga ekstrak kering *H.sabdariffa* L mempunyai aktifitas antioksidan yang dapat mencegah terjadinya aterosklerosis.³ Senyawa bioaktif utama yang berperan sebagai antioksidan adalah *protocatechuic acid (PCA)* dan *antocyanin* serta *asam askorbat*.

Melihat patomekanisme aterosklerosis, *Ox-LDL* merupakan salah satu penyebab utama proses atherogenesis diantaranya menyebabkan aktivasi NF- κ B melalui pembentukan *reactive oxygen species (ROS)*. NF- κ B merangsang banyak sekali protein/gen antara lain molekul adesi ICAM-1 dan sitokin TNF- α yang dapat memicu timbul dan berkembangnya aterosklerosis. Teh rosella merah diduga mempunyai efek pada jalur ini, namun hal ini perlu dibuktikan berikut dosis pemberiannya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek dan mekanisme kerja dari ekstrak teh Rosella Merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) terhadap penghambatan aktivasi NF- κ B dan penurunan ekspresi protein TNF- α dan ekspresi protein ICAM-1 yang memediasi terjadinya inflamasi pada aterosklerosis.

Subyek dan Metoda

Cara Pengambilan Umbilikus

Umbilikus diambil melalui persalinan spontan dengan dua duk atau melalui persalinan caesar pada kehamilan fisiologis. Kehamilan dengan preeklampsia/eklampsia, kehamilan dengan infeksi, kehamilan dengan hipertensi dan kehamilan dengan diabetes melitus tidak disertakan dalam penelitian ini. Segera setelah kelahiran, umbilikus dipotong sepanjang ± 20 cm dan langsung dimasukkan larutan cord solution (suhu 4°C). Pengerjaan kultur sel endotel tidak melebihi 12 jam setelah waktu kelahiran.

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 Teh Rosella Merah

Kultur primer sel endotel yang telah monolayer diinkubasi dengan atau tanpa ekstrak teh Rosella Merah selama 2 (dua) jam dengan dosis 0.01 mg/ml, 0.005 mg/ml dan 0.001 mg/ml kemudian ditambahkan Ox-LDL 40 mg/ml 30 menit kemudian langsung diamati pengaruhnya terhadap aktivasi NF- κ B. Setelah 24 jam diamati peningkatan ekspresi protein TNF- α dan ICAM-1.

Cara Pemeriksaan aktivasi NF- κ B, ekspresi TNF- α dan ICAM-1 secara imunohistokimia⁹

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 selam 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

Untuk mengetahui adanya efek bermakna pada berbagai perlakuan dianalisis secara statistik dengan

menggunakan *Anova*. Untuk mengetahui perbedaan nyata antar perlakuan dilanjutkan uji Duncan ($p < 0.01$). Untuk mengetahui adanya hubungan antar perlakuan digunakan uji korelasi non parametrik Spearman's ($p < 0.01$).

Hasil Penelitian

Pengukuran Aktifasi NF- κ B Secara Imunohistokimia

Gambar 1 menunjukkan hasil pengecatan imunohistokimia untuk aktifasi NF- κ B pada sel endotel vena umbilikalis manusia (HUVECs) yang telah diberi ekstrak teh rosella merah selama 2 (dua) jam dan selanjutnya dipapar Ox-LDL selama 30 menit.

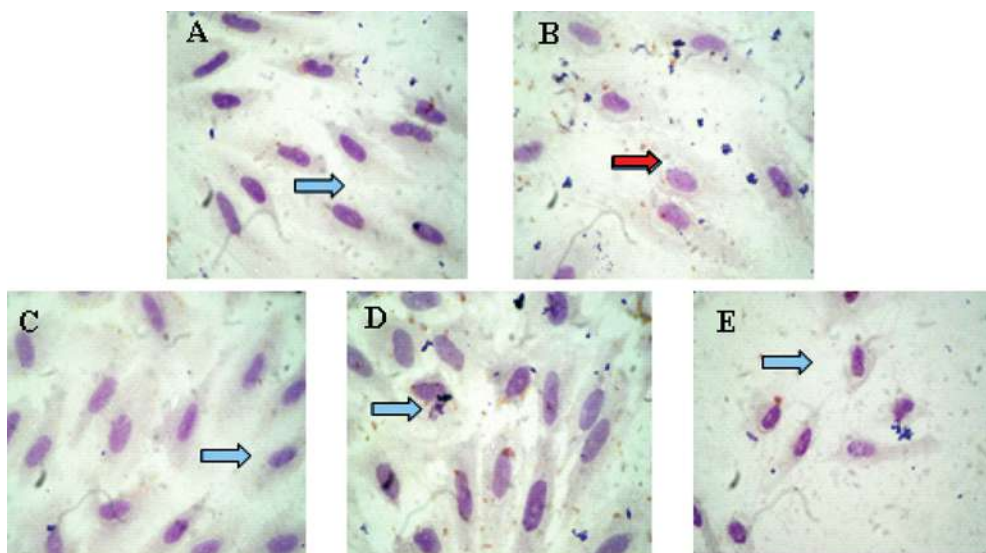
Perhitungan kuantitatif aktifasi NF- κ B menunjukkan bahwa pemberian ox-LDL mampu meningkatkan aktifasi NF- κ B, seperti terlihat dalam tabel 1. Terlihat bahwa jumlah aktifasi NF- κ B tertinggi terjadi pada kelompok perlakuan yang diberikan Ox-LDL (kontrol positif) dan terendah pada kelompok yang diberi

ekstrak teh rosella merah dengan dosis terbesar (0.01 mg/ml). Pemberian ekstrak teh 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 teh Rosella Merah, namun antar dosis ekstrak teh 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 ($p = 0.00$, correlation Coeff. = -1), didapatkan bahwa terdapat hubungan negatif antara jumlah aktifasi NF- κ B pada kelompok kontrol positif dengan jumlah aktifasi NF- κ B pada kelompok yang diberikan ekstrak teh dengan berbagai dosis. Hal ini menunjukkan bahwa semakin besar pemberian dosis ekstrak teh pada sel endotel yang telah dipapar Ox-LDL semakin kecil jumlah aktifasi NF- κ B.

Pengukuran Ekspresi Protein TNF- α Secara Imunohistokimia

Hasil pengecatan secara imunohistokimia pada kultur sel endotel vena umbilikalis manusia (HUVECs) yang



Gambar 1. Hasil sediaan sel endotel dengan pengecatan imunohistokimia untuk melihat aktifasi NF- κ B, diambil dengan mikroskop Olympus cx21 dengan perbesaran 1000x. A. Sel endotel normal (kontrol negatif), tidak terdapat aktifasi NF- κ B dengan inti sel biru terang; B. Sel endotel yang dipapar Ox-LDL 40 μ g/ml (kontrol positif), NF- κ B banyak teraktifasi dengan inti sel lebih pucat dan tipis; C. Sel endotel yang dipapar ekstrak teh dosis 0.001 mg/ml, terjadi penurunan aktifasi NF- κ B dengan inti sel lebih biru; D. Sel endotel yang dipapar ekstrak teh dosis 0.005 mg/ml, terjadi penurunan aktifasi NF- κ B lebih banyak dengan inti sel lebih biru terang; E. Sel endotel yang dipapar ekstrak teh dosis 0.01 mg/ml, tidak terjadi NF- κ B dengan inti sel lebih biru dan terang. Panah biru = positif aktifasi NF- κ B, panah merah = negatif aktifasi NF- κ B.

Tabel 1. Efek pemberian ekstrak teh rosella merah terhadap aktivasi NF- κ B

No	Kelompok Perlakuan	Jumlah Sel	Aktivasi NF- κ B($X \pm SD$)%
1.	Kontrol negatif	251	2.21 \pm 7.28 ^a
2.	Kontrol positif	175	48.40 \pm 17.84 ^b
3.	TM1 (0.001 mg/ml)	166	1.70 \pm 4.2 ^a
4.	TM2 (0.005 mg/ml)	402	0.73 \pm 2.39 ^a
5.	TM3 (0.01 mg/ml)	533	0.00 \pm 0.00 ^a

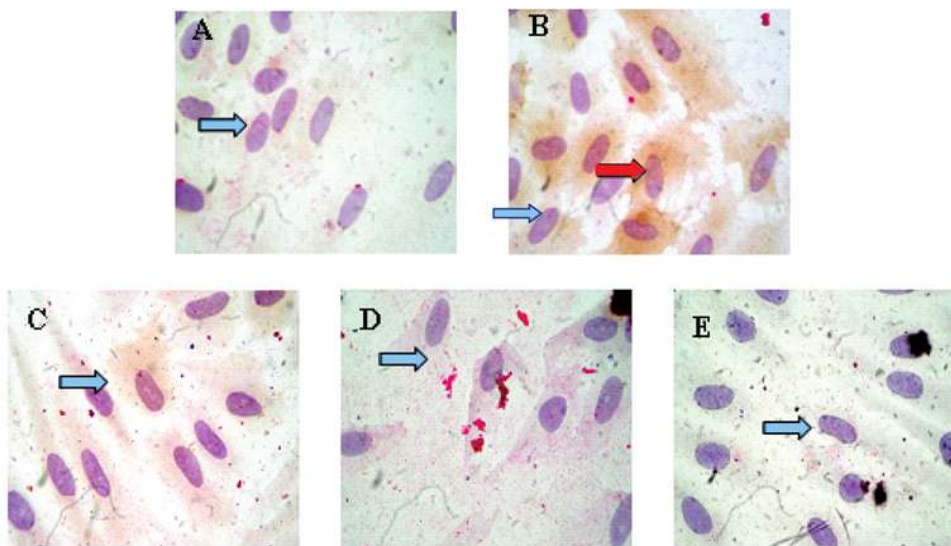
Data adalah rerata \pm SD. Berdasarkan analisis statistik Duncan ($p < 0.01$), perbedaan notasi huruf menunjukkan terdapat perbedaan nyata.

telah dipapar ekstrak teh rosella merah selama 2 (dua) jam dan selanjutnya dipapar Ox-LDL selama 24 menit ditunjukkan pada **gambar 2**.

Terlihat bahwa pada kelompok kontrol positif terjadi peningkatan ekspresi protein TNF- α ditandai dengan inti sel berwarna coklat (kecoklatan) dengan bagian sitoplasma berwarna coklat kemerahan. Hal tersebut disebabkan oleh adanya produksi sitokin TNF- α dalam sitoplasma. Dari gambar tersebut

terlihat semakin tinggi pemberian dosis ekstrak teh Rosella merah, ekspresi protein TNF- α semakin menurun dengan ditandai dengan inti sel semakin terlihat lebih biru dan jelas serta semakin berkurang warna coklat kemerahan pada sitoplasmanya.

Hasil pengukuran ekspresi protein TNF- α menunjukkan bahwa pemberian LDL teroksidasi (Ox-LDL) pada kelompok kontrol positif (40.28 \pm 16.81) meningkatkan jumlah ekspresi protein TNF-



Gambar 2. Hasil Sediaan Sel endotel dengan Pengecatan Imunohistokimia untuk melihat Ekspresi Protein TNF- α , diambil dengan mikroskop Olympus cx21 dengan perbesaran 1000x. A. Sel Endotel normal (kontrol negatif), tidak terdapat ekspresi protein TNF- α ditandai warna inti sel biru; B. Sel endotel yang dipapar Ox-LDL 40 μ g/ml (kontrol positif), banyak terdapat ekspresi protein TNF- α dengan inti sel berwarna kecoklatan bagian sitoplasma berwarna merah; C. Sel endotel yang dipapar ekstrak teh dosis 0.001 mg/ml, terjadi penurunan ekspresi protein TNF- α dengan sebagian besar inti sel warna biru; D. Sel endotel yang dipapar ekstrak teh dosis 0.005 mg/ml, ekspresi protein TNF- α berkurang lebih banyak dengan inti sel banyak berwarna biru; E. Sel endotel yang dipapar ekstrak teh dosis 0.01 mg/ml, ekspresi protein TNF- α semakin berkurang dengan lebih banyak inti sel banyak berwarna biru. Panah biru = positif TNF- α , panah merah = negatif TNF- α .

α secara signifikan dibanding kelompok normal (0.00 ± 0.00). Jumlah protein TNF- α yang terekspresi pada berbagai dosis yaitu 0.001 mg/ml, 0.005 mg/ml dan 0.01 mg/ml menurun secara bermakna ($p < 0.01$) berturut-turut 36.23 %, 38.19 %, 38.61% dibanding pada kontrol positif (tabel 2).

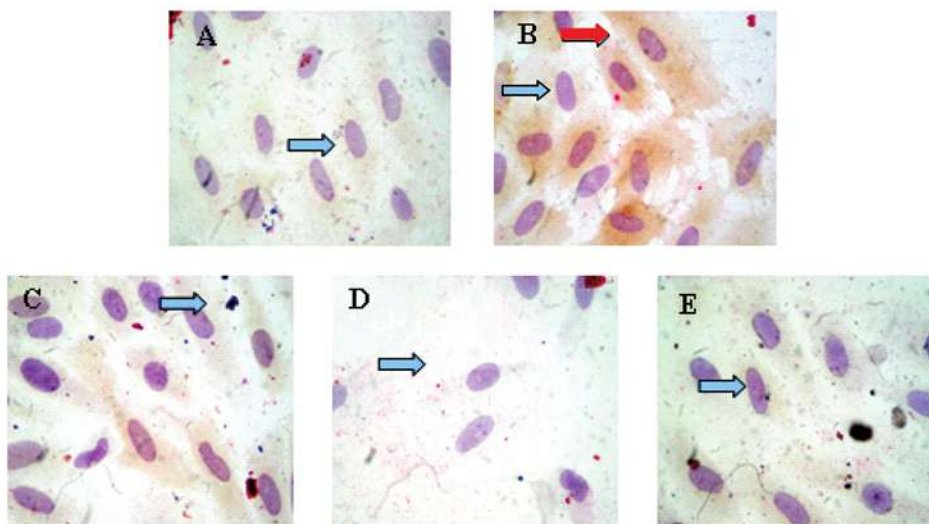
Pengukuran Ekspresi Protein ICAM-1 Secara Imunohistokimia

Gambar 3 menunjukkan hasil pengecatan imunohistokimia untuk melihat ekspresi protein ICAM-1 pada kultur sel HUVECs yang telah diberi ekstrak teh rosella merah selama 2 (dua) jam dan selanjutnya dipapar Ox-LDL selama 24 jam.

Tabel 2. Efek Pemberian ekstrak teh rosella merah terhadap ekspresi protein TNF- α

No	Kelompok Perlakuan	Jumlah Sel	Ekspresi Protein TNF- α (X \pm SD)%
1.	Kontrol negatif	147	0.00 \pm 0.00 ^a
2.	Kontrol positif	267	40.28 \pm 16.81 ^b
3.	TM1 (0.001 mg/ml)	220	4.05 \pm 8.72 ^a
4.	TM2 (0.005 mg/ml)	267	2.09 \pm 6.56 ^a
5.	TM3 (0.01 mg/ml)	239	1.67 \pm 7.45 ^a

Data adalah rerata \pm SD. Berdasarkan analisis statistik Duncan ($p < 0.01$), perbedaan notasi huruf menunjukkan terdapat perbedaan nyata.



Gambar 3. Hasil Sediaan Sel endotel dengan Pengecatan Imunohistokimia untuk melihat Ekspresi Protein ICAM-1, diambil dengan mikroskop Olympus cx21 dengan perbesaran 1000x. A. Sel Endotel normal (kontrol negatif), tidak terdapat ekspresi protein ICAM-1 ditandai warna inti sel biru, permukaan membran tidak berwarna kecoklatan; B. Sel endotel yang dipapar Ox-LDL 40 μ g/ml (kontrol positif), banyak terdapat ekspresi protein ICAM-1 dengan inti sel berwarna kecoklatan bagian permukaan membran berwarna coklat; C. Sel endotel yang dipapar ekstrak teh dosis 0.001 mg/ml, terjadi penurunan ekspresi protein ICAM-1 dengan sebagian inti sel warna biru; D. Sel endotel yang dipapar ekstrak teh dosis 0.005 mg/ml, ekspresi protein ICAM-1 berkurang lebih banyak dengan inti sel banyak berwarna biru; E. Sel endotel yang dipapar ekstrak teh dosis 0.01 mg/ml, ekspresi protein ICAM-1 semakin berkurang dengan lebih banyak inti sel banyak berwarna biru. Panah biru = positif ICAM-1, panah merah = negatif ICAM-1.

Dari gambar diatas, hasil pengecatan imunohistokimia untuk mengukur ekspresi protein ICAM-1 menunjukkan hasil yang serupa dengan pengecatan imunohistokimia untuk mengukur ekspresi protein TNF- α . Dari gambar tersebut dapat dilihat bahwa semakin tinggi pemberian dosis ekstrak teh Rosella merah, ekspresi protein ICAM-1 semakin menurun ditandai dengan berkurangnya permukaan membran yang berwarna kecoklatan sehingga menunjukkan bahwa semakin bertambah dosis ekstrak yang diberikan semakin berkurang jumlah ekspresi protein ICAM-1-nya.

Hasil pengukuran ekspresi protein ICAM-1 menunjukkan jumlah protein ICAM-1 yang ter-ekspresi pada kelompok perlakuan yang diberikan ekstrak teh rosella Merah dengan berbagai dosis yaitu 0.001 mg/ml, 0.005 mg/ml dan 0.01 mg/ml menurun secara bermakna ($p < 0.01$) berturut-turut 71.68 %, 94.2 %, 95.46 % dibanding pada kontrol positif (tabel 3). Ekspresi protein ICAM-1 tertinggi pada kelompok kontrol positif dan terendah pada kelompok yang diberikan ekstrak teh rosella merah dosis terbesar yaitu 0.01 mg/ml.

Diskusi

Penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak teh rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) dapat menghambat aktivasi NF- κ B, menurunkan ekspresi protein TNF- α dan ICAM-1 secara signifikan dibandingkan pada kelompok kontrol positif. Penelitian ini mendukung penelitian lainnya bahwa ekstrak teh rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) mempunyai aktifitas antioksidan.⁴ Diduga zat bioaktif yang mempunyai aktifitas antioksidan dan berperan dalam menghambat aktivasi NF- κ B adalah senyawa

penolik terutama protocatechuic acid (PCA) dan flavonoid-antosianin.⁵ 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. Efek penghambatan antioksidan pada aktivasi NF- κ B telah dibuktikan melalui penghambatan degradasi I κ B, penghambatan aktivasi enzim kinase I κ B sehingga tidak terjadi fosforilasi akibatnya dimer NF- κ 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- κ B melalui penghambatan ikatan pada gen target (*DNA binding domain*).⁶ Hal ini diperkuat oleh penelitian lain bahwa PCA terbukti mempunyai kemampuan dalam menghambat aktivasi NF- κ B melalui penghambatan degradasi I κ B pada HUVECs.⁷ Dijelaskan bahwa aktifitas antioksidan yang dimiliki PCA dalam menghambat oksidasi LDL lebih tinggi dibandingkan vitamin C melalui penghambatan degradasi kolesterol dan fragmentasi apo B.⁸

Selain PCA, dilaporkan kandungan flavonoid-antosianin (*Hibiscus anthocyanins* /HAs) pada teh rosella merah mempunyai aktifitas antioksidan dalam sistem liposomal.⁹ Dibuktikan bahwa 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.¹⁰ Sedangkan kandungan antosianin dan flavon dalam ekstrak kasar calyces Roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn) secara hidroalkoholik pada *in vivo* terbukti sebagai angio protektif.¹¹ Penelitian lain membuktikan

Tabel 3. Efek Pemberian Ekstrak teh Rosella Merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) Terhadap Ekspresi Protein ICAM-1

No	Kelompok Perlakuan	Jumlah Sel	Ekspresi Protein ICAM-1 (X \pm SD)%
1.	Kontrol negatif	147	0.00 \pm 0.00 ^a
2.	Kontrol positif	267	96.17 \pm 12.39 ^b
3.	TM1 (0.001 mg/ml)	220	7.32 \pm 13.53 ^a
4.	TM2 (0.005 mg/ml)	267	1.97 \pm 5.46 ^a
5.	TM3 (0.01 mg/ml)	239	0.71 \pm 3.19 ^a

Data adalah rerata \pm SD. Berdasarkan analisis statistik Duncan ($p < 0.01$), perbedaan notasi huruf menunjukkan terdapat perbedaan nyata.

bahwa antosianin dalam ekstrak kering kelopak Roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn) mampu menghambat stress oksidatif,¹² yang menginduksi aktivasi NF-κB. Antosianin dan flavon telah terbukti dapat menghambat LDL oksidasi dan menghambat aktivasi NF-κB serta menurunkan inflamasi. 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 prekursoranya baik secara in vivo dan in vitro. Disamping itu, flavonoid-antosianin 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 Chemo-tactic Protein-1 (MCP-1).⁵

Aktifitas biologi dari antosianin (bioflavonoid), salah satunya adalah meningkatkan efektifitas kerja dari vitamin C,¹³ sehingga meningkatkan aktifitas antioksidan vitamin C. Efek penghambatan Teh Rosella Merah (*Hibiscus sabdariffa* L) terhadap aktivasi NF-κB diduga karena kandungan vitamin C-nya mampu melindungi LDL kolesterol dari kerusakan oksidatif dan mempunyai potensi anti inflamasi sehingga mampu mencegah aterosklerosis (antiaterosklerotik).

Hal ini sejalan dengan penelitian lain 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.¹⁴ Melalui mekanisme penghambatan pada oksidasi LDL, aktivasi NF-κB juga dapat dihambat.

Namun berdasarkan analisis beda nyata menggunakan Duncan ($p < 0.01$), ternyata antar berbagai dosis pemberian ekstrak teh 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 didapatkan korelasi negatif dan bermakna antara aktivasi NF-κB, ekspresi TNF-α dan ICAM-1 dengan pemberian ekstrak teh Rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn). Hal ini berarti semakin tinggi dosis pemberian ekstrak teh Rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn), aktivasi NF-κB semakin berkurang.

Hal ini disebabkan oleh adanya efek penghambatan dari ekstrak teh Rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) terhadap aktivasi NF-κB akibat induksi Ox-LDL

Kesimpulan

Pemberian ekstrak teh Rosella Merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) berbagai dosis (0.001 mg/ml, 0.005 mg/ml, 0.01 mg/ml) pada HUVECs yang dipapar LDL teroksidasi dapat menghambat aktivasi NF-κB, menghambat peningkatan ekspresi protein TNF-α dan ICAM-1.

Keterbatasan penelitian.

Keterbatasan penelitian ini adalah metode pemeriksaan yang digunakan (imunohistokimia) yang pada dasarnya merupakan pemeriksaan kualitatif, oleh karena itu diperlukan penelitian lebih lanjut menggunakan metode pengukuran yang bersifat kuantitatif dan lebih akurat.

Daftar Pustaka

1. Tjokroprawiro, A. Diabetes Up Date 1997 Dalam : Proceedings Of The Third Surabaya Diabetes Up Data, Surabaya, 1997:1-21
2. Ross, Russell. Atherosclerosis-An Inflammatory Disease. N. Eng J Med, 1999; 340:115-126
3. Chang-che chew, et al. Hibiscus Sabdariffa Extract Inhibits The Development Atherosclerosis In Cholesterol-Fed Rabbit. Journal Of Agricultural And Food Chemistry, 2003.
4. Tseng, T.H., et al. Hibiscus Protocatechuic Acid Protecct Against Oxidative Damage Induced By Tert. Butylhydroperoxide In Rat Primary Hepatocytes. Chem Biol Interact. 1996; 101(2):137-148
5. Ranzio B. Anti Inflammatory Activities Of Polyphenol-Review : Polyphenol As Anti Inflammatory Agents. Journal Of Naturopathic Medicine 2002; 9:44-50
6. Ho, Emily. The Virtual Free Radical School : NF-κB- What Is It And What'S The Deal With Radicals?. Linus Pauling Institute Scintist, Departement Of Nutrition & Food Management, Oregon State University, 2002.
7. Stache et al. Inhibition Of TNF-Alpha Induced Cell Death In Human Umbilical Vein Endothelial Cells And Jurkat Cell By Protocatechuic Acid. NCBI, Med. Biol. Eng. Comput 2002; 40(6):689-703.

8. Lee Mj , et al. Hibiscus Protocatechuic Acid Or Esculetin Can Inhibit Oxidative LDL Induced By Either Copper Ion Or Nitric Oxide Donor. *Journal Agriculture Food Chemical* 2002; 50(7):2130-2136
9. Farombi, Olatunde E. Review : African Indigenous Plants With Chemotherapeutic Potentials And Biotechnological Approach To The Production Of Bioactive Prophylactic Agent. *African Journal Of Biotechnology* 2003; 2(12):662-671.
10. Tseng, T.H., et al. Protective Effect Of Dried Flower Extract Of Hibiscus Sabdariffa Linn Againts Oxidative Stress In Rat Primery Hepatocytes. *Food Chem Toxicol* 1997; 35(12):1159-1164.
11. Jonadet, M, et al. In Vitro Enzyme Inhibitory And In Vivo Cardioprotective Activities Of Hibiscus (Hibiscus Sabdariffa Linn). *Journal Pharmacology. Belg* 1990;45 (2):120-124
12. Ali, BH., Mousa HM., El Mougys. The Effect Of Water Extract And Anthocyanins Of Hibiscus Sabdariffa Linn On Paracetamol-Induced Hepatotoxicity In Rats. <http://www.google.com>, 2003.
13. Wolinski, Ira., Hickson, James F. *CRC Series In Modern Nutrition : Hanbook Of Nutraceutical And Functional Foods*. CRC Press, LLC, Florida, 2000.
14. Collins, Tucker., Cybulsky, Myron I. NF- κ B : Pitoval Mediator Or Innocent Bystander In Atherogenesis ?. *The Journal Of Clinical Investigation*, 2001; 107(3):255-263.