



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**Pengaruh *Hibiscus Sabdariffa* Linn. terhadap faktor transkripsi  
pencokelatan (*beiging*) pada tikus obese: Kajian ekspresi PPAR $\gamma$   
dan PGC-1 $\alpha$**

**TESIS**

**HERIYANTO  
1606839776**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
JAKARTA  
DESEMBER 2019**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**Pengaruh *Hibiscus Sabdariffa* Linn. terhadap faktor transkripsi  
pencokelatan (*beiging*) pada tikus obese: Kajian ekspresi PPAR $\gamma$   
dan PGC-1 $\alpha$**

**TESIS**

**HERIYANTO  
1606839776**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
KEKHUSUSAN FISILOGI  
JAKARTA  
DESEMBER 2019**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar

Nama : Heriyanto

NPM : 1606839776

Tanda Tangan :



Tanggal : 19 Desember 2019

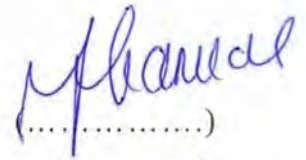
## HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :  
Nama : Heriyanto  
NPM : 1606839776  
Program Studi : Program Magister Ilmu Biomedik  
Judul Tesis : Pengaruh *Hibiscus Sabdariffa* Linn. terhadap faktor transkripsi pencokelatan (*beiging*) pada tikus obese: Kajian ekspresi PPAR $\gamma$  dan PGC-1 $\alpha$

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Biomedik (M.Biomed) pada Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. dr. Neng Tine Kartinah, M.Kes., AIFO

  
(.....)

Pembimbing II : dr. Imelda Rosalyn Sianipar, M.Biomed., Ph.D

  
(.....)

Penguji I : Dr. dr. Trinovita Andraini M.Biomed

  
(.....)

Penguji II : dr. Dante Saksono Harbuwono Sp.PD., Ph.D.

  
(.....)

Penguji III : dr. Vivian, Sp.FK., Ph.D

  
(.....)

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 19 Desember 2019

Ketua Program Magister Ilmu Biomedik:

Prof. Dr. rer. physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi



  
(.....)

## KATA PENGANTAR

Tesis ini disusun sebagai salah satu syarat dalam proses menyelesaikan studi Program Magister Ilmu Biomedik pada Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Tesis ini dapat diselesaikan dengan atas bantuan dari berbagai banyak pihak. Dengan ini juga penulis mengucapkan terimakasih yang tak terhingga kepada:

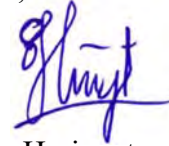
1. Kedua orang tua penulis serta seluruh saudara penulis yang senantiasa bersabar, memberikan semangat serta doa selama penulis menjalani studi.
2. Seluruh Staf Pengajar Kekhususan Fisiologi PMIB yang telah banyak mengarahkan, membimbing dan memberikan semangat pada penulis dalam mempelajari berbagai Ilmu Fisiologi Kedokteran.
3. Dr. dr. Neng Tine Kartinah, M.Kes., AIFO sebagai Pembimbing Akademik dan pembimbing tesis yang telah meluangkan waktu berharganya untuk membimbing penulis selama proses penyelesaian penelitian dan penyusunan tesis.
4. dr. Imelda Rosalyn Sianipar, M.Biomed., Ph.D sebagai pembimbing tesis kedua yang telah meluangkan waktu berharganya untuk membimbing penulis selama proses penyelesaian penelitian dan penyusunan tesis.
5. Afifa, Novi, dan Nisa sebagai teman seperjuangan yang saling membantu dan saling menolong serta telah berbagi banyak hal yang berharga sepanjang perjalanan studi penulis hingga dapat menyelesaikan tugasnya.
6. Laboratorium Fakultas Kedokteran Gigi yang telah memberikan tempat untuk dapat melaksanakan penelitian dengan baik.
7. Seluruh staf administrasi dan tata usaha Departemen Fisiologi FKUI.
8. Pak Danny dan Staf PMIB FKUI yang sangat membantu sepanjang perjalanan studi penulis, dari awal penulis studi hingga selesai.
9. Seluruh laboran yang tidak dapat saya sebutkan satu per satu karena sangat banyak, yang telah membantu dalam proses penelitian ini hingga penelitian ini dapat diselesaikan dengan baik.
10. Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat Universitas Indonesia (DRPMUI) yang telah memberikan bantuan HIBAH sehingga dapat memudahkan penulis dalam menyelesaikan studi penulis.

11. Seluruh pihak yang turut serta berkontribusi baik secara langsung maupun tidak langsung dalam penyelesaian studi penulis.

Penulis berharap agar tesis ini dapat memberikan sumbangsih bagi perkembangan ilmu pengetahuan dan dapat berkontribusi dalam penanganan masalah kesehatan yang ada dalam masyarakat saat ini hingga dikemudian hari.

Penulis juga sangat berterima kasih kepada Tuhan Yang Maha Esa atas segala bantuan dan petunjuk sehingga saya dapat menyelesaikan tesis ini dengan baik, serta saya juga berharap semoga hal ini dapat bermanfaat untuk memperbaiki kehidupan manusia.

Jakarta, 19 Desember 2019



Heriyanto

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS  
AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

---

Sebagai civitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Heriyanto  
NPM : 1606839776  
Program Studi : Program Magister Ilmu Biomedik  
Departemen : Fisiologi Kedokteran  
Fakultas : Kedokteran  
Janis Karya : Tesis

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

**Pengaruh *Hibiscus Sabdariffa* Linn. terhadap faktor transkripsi pencokelatan (*beiging*) pada tikus obese: Kajian ekspresi PPAR $\gamma$  dan PGC-1 $\alpha$**

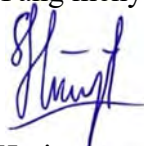
Beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta

Pada Tanggal : 19 Desember 2019

Yang menyatakan



Heriyanto

## ABSTRAK

Nama : Heriyanto  
Program Studi : Program Magister Ilmu Biomedik  
Judul Tesis : Pengaruh *Hibiscus Sabdariffa* Linn. terhadap faktor transkripsi pencoklatan (*beiging*) pada tikus obese: Kajian ekspresi PPAR $\gamma$  dan PGC-1 $\alpha$

Salah satu penanganan obesitas melalui proses pencoklatan yang meningkatkan thermogenesis. Proses pencoklatan melibatkan faktor transkripsi PPAR $\gamma$  dan PGC1 $\alpha$ . Saat ini diketahui pengaruh *H. sabdariffa* dalam menghambat adipogenesis, namun pengaruhnya pada proses pencoklatan masih belum diketahui. Tujuan penelitian untuk mengetahui pengaruh *H. sabdariffa* pada proses pencoklatan. Penelitian eksperimental menggunakan 24 ekor tikus *Sprague Dawley* jantan (*Rattus Norvegicus*) dengan berat 90-160 gram, usia 6-10 minggu, dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok kontrol (KH0), kelompok kontrol obes dengan pakan khusus (OH0), kelompok obes diberikan ekstrak *H. sabdariffa* 200 mg/KgBB (OH200), Kelompok obes diberikan ekstrak *H. sabdariffa* 400 mg/KgBB (OH400). Pemberian *H. Sabdariffa* dilakukan selama 5 minggu, selanjutnya dilakukan pemeriksaan dengan RT-qPCR. Pemberian ekstrak *H. sabdariffa* meningkatkan ekspresi PPAR $\gamma$  dan PGC1 $\alpha$  sebagai faktor transkripsi proses pencoklatan. Hal ini didukung dengan penurunan Indeks Lee hingga normal. Kesimpulan: Ekstrak *H. sabdariffa* meningkatkan ekspresi faktor transkripsi proses pencoklatan PPAR $\gamma$  dan PGC1 $\alpha$  sehingga memberikan hasil penurunan Indeks Lee yang merupakan salah satu indikator obesitas pada tikus.

Kata Kunci: Hibiscuss Sabdariffa Linn., indeks Lee, PPAR $\gamma$ , PGC-1 $\alpha$ , proses Pencoklatan



## ABSTRACT

Name : Heriyanto  
Study Program : Program Magister Ilmu Biomedik  
Judul Tesis : Effect of *Hibiscus Sabdariffa* Linn. on transcription factor of beiging in obese rats: study expression of PPAR $\gamma$  and PGC-1 $\alpha$

The browning process that increase thermogenesis become one of the option to treat obesity. Beiging process involves PPAR $\gamma$  and PGC1 $\alpha$  transcription factors. The effect of *H. sabdariffa* in holding adipogenesis is known, but its effect on the beiging process is still unknown. The purpose of this study was to determine the effect of *H. sabdariffa* on the beiging process. The experimental study used 24 male Sprague Dawley rats (*Rattus Norvegicus*) weighing 90-160 grams, 6-10 weeks old, divided into 4 groups known as control group (KH0), the obesity control group with high fat diet (OH0), the obesity group was given *H. sabdariffa* extract 200 mg / KgBW (OH200), the obese group was given *H. sabdariffa* extract 400 mg / KgBW (OH400). The administration of *H. Sabdariffa* was carried out for 5 weeks, then it was examined by RT-qPCR. The administration of *H. sabdariffa* extract increased the expression of PPAR $\gamma$  and PGC1 $\alpha$  as transcription factors for beiging process. This is supported by the decline in the Lee Index to normal. Conclusion: *H. sabdariffa* extract increased the expression of browning process transcription factor PPAR $\gamma$  and PGC1 $\alpha$  which resulted in decreased Lee index, an indicator of obesity in rat.

Key words: Hibiscuss Sabdariffa Linn., Lee Index, PPAR $\gamma$ , PGC-1 $\alpha$ , Beiging process.

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....</b>	<b>i</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN .....</b>	<b>ii</b>
<b>KATA PENGANTAR .....</b>	<b>iii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS .....</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRAK.....</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>vii</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>viii</b>
<b>DAFTAR TABEL.....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR SINGKATAN.....</b>	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xiv</b>
<b>BAB 1 PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Pertanyaan Penelitian.....	3
1.4 Hipotesis .....	3
1.5 Tujuan Penelitian .....	3
1.5.1 Tujuan Umum .....	3
1.5.2 Tujuan Khusus .....	3
1.6 Manfaat Penelitian .....	4
1.7 Kerangka Teori .....	4
1.8 Kerangka Konsep.....	5
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>6</b>
2.1 Obesitas.....	6
2.2 Mekanisme Pencoklatan .....	7
2.3 Peroxisome Proliferator Activated Receptors (PPARs) .....	11
2.3.1 PPAR $\alpha$ .....	13
2.3.2 PPAR $\beta/\delta$ .....	13
2.3.3 PPAR $\gamma$ .....	14

2.4 Peroxisome proliferasor-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (Pgc-1 $\alpha$ ) .....	16
2.5 Hibiscuss Sabdariffa Linn.....	17
Komposisi kimia .....	20
2.6 Potensi Hibiscuss Sabdariffa Linn. untuk penanganan Obesitas .....	22
<b>BAB 3 METODE PENELITIAN .....</b>	<b>28</b>
3.1 Desain Penelitian .....	28
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	28
3.3 Persetujuan Etik .....	28
3.4 Subjek dan Sampel Penelitian.....	28
3.5 Penetapan Jumlah Hewan Coba.....	29
3.6 Kriteria Inklusi dan Eksklusi .....	29
3.6.1 Kriteria inklusi .....	29
3.6.2 Kriteria Eksklusi.....	29
3.7 Identifikasi Variabel .....	29
3.8 Alat dan Bahan.....	29
3.8.1 Alat.....	29
3.8.2 Bahan Penelitian dan Reagensia .....	30
3.9 Cara Kerja .....	30
3.9.1 Pengelompokan Hewan Coba .....	30
3.9.2 Pemberian Ekstrak Hibiscuss Sabdariffa Linn.....	31
3.9.3 Pengukuran indeks Lee .....	31
3.9.4 Prosedur Pengambilan Sampel.....	31
3.9.4.1 Prosedur Dekapitasi dan Pengambilan Jaringan Lemak.....	31
3.9.5 <i>Pemurnian</i> RNA.....	32
3.9.5.1 Persiapan sampel .....	32
3.9.5.2 <i>Pemurnian RNA / RNA Purification</i> .....	32
3.9.6 Sintesis cDNA.....	33
3.9.6.1 <i>Genomic DNA Removal (DNase 1 treatment)</i> .....	33
3.9.6.2 <i>Reverse transcription (cDNA synthesis)</i> .....	33
3.9.7 Metode Pemeriksaan Menggunakan Realtime PCR .....	34
3.10 Definisi Operasional .....	36

3.11 Analisis Data.....	36
3.12 Alur Penelitian .....	37
<b>BAB 4 HASIL PENELITIAN .....</b>	<b>38</b>
4.1 Pengaruh <i>H. sabdariffa</i> pada tikus obes terhadap ekspresi PPAR $\gamma$ di jaringan adiposa .....	38
4.2 Pengaruh <i>H. sabdariffa</i> pada tikus obes terhadap ekspresi PGC-1 $\alpha$ di jaringan adiposa .....	39
4.3 Pengaruh <i>H. sabdariffa</i> pada tikus obes terhadap indeks Lee .....	40
<b>BAB 5 PEMBAHASAN .....</b>	<b>42</b>
5.1 Pengaruh <i>H. sabdariffa</i> pada tikus obes dilihat dari ekspresi PPAR $\gamma$ pada jaringan adiposa .....	42
5.2 Pengaruh <i>H. sabdariffa</i> pada tikus obes dilihat dari ekspresi PGC-1 $\alpha$ pada jaringan adiposa .....	43
5.3 Pengaruh <i>H. sabdariffa</i> pada tikus obes dilihat dari indeks Lee .....	45
<b>BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>47</b>
6.1 Kesimpulan .....	47
6.2 Saran .....	47
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>48</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>53</b>
<b>RIWAYAT HIDUP .....</b>	<b>77</b>
<b>DANA PENELITIAN .....</b>	<b>78</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Klasifikasi obesitas berdasarkan WHO yang diadopsi dari WHO 1995, WHO 2000, WHO 2004.....	6
Tabel 2. Fitokimia dari rosella. ....	20
Tabel 3. Efek ekstrak H. Sabdariffa dalam obesitas. ....	23
Tabel 4. Komposisi asam amino dari ekstrak H. Sabdariffa.....	23
Tabel 5. Manfaat ekstrak H. sabdariffa pada obesitas.....	26
Tabel 6. Pembuatan Master mix.....	35
Tabel 7. Definisi Operasional.....	36

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Diferensiasi adiposit putih, adiposit coklat, adiposit <i>beige</i> dan miosit.	8
Gambar 2. Morfologi dari tiga adiposit berbeda, kiri WAT, tengah BAT, kanan Beige.....	9
Gambar 3. Regulasi perkembangan BAT. ....	10
Gambar 4. Regulasi transkripsi perkembangan beige adiposit. ....	11
Gambar 5. Struktur PPARs. ....	11
Gambar 6. Regulasi transkripsi oleh protein PPAR. ....	12
Gambar 7. Mekanisme regulasi genetik oleh PPARs. ....	13
Gambar 8. Isoform struktur PPAR.....	14
Gambar 9. PPAR $\gamma$ mengaktivasi pemakaian energi.....	16
Gambar 10. Hibiscus Sabdariffa Linn. (rosella). A. Tanaman rosella, B.kaliks kering, C.kaliks segar yang baru dipanen. ....	18
Gambar 11. Ekspresi rata-rata PPAR $\gamma$ . ....	38
Gambar 12. Ekspresi rata-rata PGC1 $\alpha$ . ....	39
Gambar 13. Nilai rata-rata Indeks Lee. ....	40

## DAFTAR SINGKATAN

IMT	: Indeks Masa Tubuh / BMI ( <i>Body Mass Index</i> )
WAT	: <i>White Adipose Tissue</i> (Adiposa putih)
BAT	: <i>Brown Adipose Tissue</i> (Adiposa coklat)
PPARs	: <i>Peroxisome proliferator-activated receptors</i>
PPAR $\gamma$	: <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma</i>
PPRE	: <i>Ppar response element</i>
RXR	: <i>Retinoid X receptor</i>
TZDs	: <i>Thiazolidenidiones</i>
PGC-1 $\alpha$	: <i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i>
H. sabdariffa	: <i>Hibiscus sabdariffa</i> Linn.
UCP1	: <i>Uncoupling Protein 1</i>
GAPDH	: <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
PRDM-16	: <i>PR Domain containing 16</i>
HFD	: <i>High Fat Diet</i> (Diet Tinggi Lemak / tinggi kalori)
SREBP-1c	: <i>Sterol regulatory element-binding protein</i>
KLF11	: <i>Krupple-like factor 11</i>
C/EBP $\alpha$	: <i>CCAAT/enhancer-binding protein <math>\alpha</math></i>
CtBP	: <i>C-terminal- binding protein</i>
ChIP	: <i>chromatin immunoprecipitation</i>
EBF2	: <i>early B cell factor-2</i>

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Lulus Kaji Etik .....	53
Lampiran 2. Dokumentasi Penelitian .....	54
Lampiran 3. Sertifikat Pengujian Ekstrak <i>H. sabdariffa</i> .....	57
Lampiran 4. Laporan Hasil Pengujian Ekstrak <i>H. sabdariffa</i> .....	58
Lampiran 5. Hasil Analisa Kadar Air Ekstrak <i>H. sabdariffa</i> .....	59
Lampiran 6. Hasil Analisa Pakan Tikus .....	60
Lampiran 7. Cara perhitungan dosis dan pemberian sediaan ekstrak <i>H. sabdariffa</i> .....	61
Lampiran 8. Bukti Submit Artikel .....	63
Lampiran 9. Draft Artikel .....	64



## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Berdasarkan data *World Health Organization* (WHO), penderita obes meningkat sebanyak dua kali lipat sejak tahun 2000 hingga 2016. Pada tahun 2000 penderita obes sebanyak 8,7 persen, sedangkan pada tahun 2016, naik menjadi 13,1 persen.<sup>1</sup> Sebanyak 1,9 miliar dan 650 juta orang dewasa berusia lebih dari 18 tahun mengalami kelebihan berat badan dan obesitas pada tahun 2016.<sup>2,3</sup> Berdasarkan data Riset Kesehatan Dasar tahun 2018 di Indonesia, prevalensi berat badan berlebih sebesar 13,6 persen lebih tinggi dibanding tahun 2007 sebesar 8,6 persen, sedangkan prevalensi obesitas pada tahun 2018 sebesar 21,8 persen, meningkat dua kali lipat dibandingkan pada tahun 2007 sebesar 10,5 persen.<sup>4</sup>

Tidak seimbangnya asupan energi dengan pemakaian energi menyebabkan obesitas, dengan kondisi asupan lebih tinggi dari penggunaan energi.<sup>5,6</sup> Obesitas memiliki ciri peningkatan masa lemak dan berat badan.<sup>7</sup> Simpanan energi dalam tubuh dapat berupa glikogen yang terdapat sel hati dan sel otot, serta lemak yaitu trigliserida pada jaringan adiposa yang terdistribusi diberbagai tempat dalam tubuh.<sup>8,9</sup>

Ada 3 tipe jaringan adiposa yaitu *Brown Adipose Tissue* (BAT) atau adiposa coklat, *White Adipose Tissue* (WAT) atau adiposa putih, dan *beige adipose tissue* atau adiposa *beige*. Jaringan adiposa putih berperan sebagai homeostasis lemak dan menjaga keseimbangan energi, serta menyimpan cadangan energi dalam bentuk trigliserida.<sup>10</sup> Jaringan adiposa coklat umumnya menghasilkan energi berupa panas dengan membakar asam lemak. *Beige adipose tissue* memiliki sifat menyerupai BAT yaitu memiliki banyak mitokondria dan thermogenesis. *Beige adipose tissue* dihasilkan dari perubahan WAT melalui proses pencoklatan (*beiging* atau *browning*).<sup>8,9,11-14</sup> Proses pencoklatan dapat berperan dalam meningkatkan penggunaan energi melalui peningkatan aktivitas thermogenesis, dengan demikian proses pencoklatan / *beiging* menjadi salah satu pendekatan dalam penanganan obesitas.

Proses pencoklatan dipengaruhi ekspresi peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ). PPAR $\gamma$  bersama dengan PR domain containing-16 (PRDM-16) mengaktivasi PPAR $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) untuk menginduksi pencoklatan.<sup>9</sup> Kemudian PGC-1 $\alpha$  akan meningkatkan ekspresi gen UCP1. *Uncoupling Protein I* (UCP1) merupakan fitur pada adiposit coklat yang bertanggung jawab dalam kemampuan thermogenesis di jaringan adiposa coklat.<sup>15</sup>

Proses pencoklatan ini diinduksi oleh beberapa stimulus, termasuk latihan fisik, faktor lingkungan serta induksi dari obat. Beberapa tanaman herbal sudah diketahui dapat digunakan untuk penanganan obesitas. Rosella / *H. sabdariffa* yang dikenal juga sebagai teh merah juga diketahui memiliki potensi untuk penanganan obesitas. *H. sabdariffa* telah diketahui dapat menangani obesitas oleh karena perannya dalam mengurangi akumulasi lemak dan menghambat peningkatan berat badan. Berdasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Chang menunjukkan bahwa pemberian *H. sabdariffa* sebesar 450 mg perhari selama 12 minggu pada orang obesitas (BMI  $\geq$  25) terbukti menurunkan berat badan, indeks masa tubuh, persentase lemak tubuh dan *waist to hip ratio*.<sup>16-19</sup> Kandungan zat aktif dari tanaman Rosella terbanyak terdapat pada bagian bunganya yang terdiri atas kaliks. Kaliks tanaman Rosella diantaranya memiliki kandungan flavonoid seperti quercetin yang dapat memengaruhi proses pencoklatan khususnya terhadap pengaktifan jalur PPAR $\gamma$ . Ini didukung penelitian Otieno dimana quercetin meningkatkan ekspresi UCP1, PRDM16, PGC1 $\alpha$  yang merupakan faktor transkripsi proses pencoklatan dan juga menurunkan berat badan.<sup>5,20-24</sup>

Berdasarkan penelitian terdahulu yang telah menggunakan ekstrak *H. sabdariffa* dengan dosis 200 mg/KgBB/hari dan 400 mg/KgBB/hari pada resistensi insulin.<sup>16,82</sup> Oleh karena itu, pada penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh *H. sabdariffa* 200 mg/KgBB/hari dan juga 400 mg/KgBB/hari terhadap proses pencoklatan melalui perubahan ekspresi PPAR $\gamma$  dan PGC-1 $\alpha$  pada tikus obes.

## 1.2 Rumusan Masalah

Obesitas menyebabkan akumulasi lipid yang berlebihan dalam tubuh, dan saat ini di masyarakat banyak digunakan *H. sabdariffa* untuk penanganan obesitas. Pendekatan terapeutik mutakhir penanganan obesitas melalui proses pencoklatan pada jaringan adiposa putih diregulasi melalui PPAR $\gamma$  dan PGC-1 $\alpha$ . Namun

pengaruh *H. sabdariffa* pada mekanisme pencoklatan jaringan adiposa melalui perubahan ekspresi PPAR dan PGC-1 $\alpha$  masih belum diketahui.

### 1.3 Pertanyaan Penelitian

1. Apakah terdapat pengaruh *H. sabdariffa* terhadap ekspresi PPAR $\gamma$  pada tikus obes?
2. Apakah terdapat pengaruh *H. sabdariffa* terhadap ekspresi PGC-1 $\alpha$  pada tikus obes?
3. Apakah terdapat pengaruh *H. sabdariffa* terhadap indeks Lee pada tikus obes?

### 1.4 Hipotesis

1. *H. sabdariffa* meningkatkan ekspresi PPAR $\gamma$  pada tikus obes.
2. *H. sabdariffa* meningkatkan ekspresi PGC1 $\alpha$  pada tikus obes.
3. *H. sabdariffa* menurunkan nilai indeks Lee pada tikus obes.

### 1.5 Tujuan Penelitian

#### 1.5.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui pengaruh ekstrak *H. sabdariffa* pada proses pencoklatan melalui perubahan ekspresi PPAR $\gamma$ , dan ekspresi PGC-1 $\alpha$  pada tikus obes.

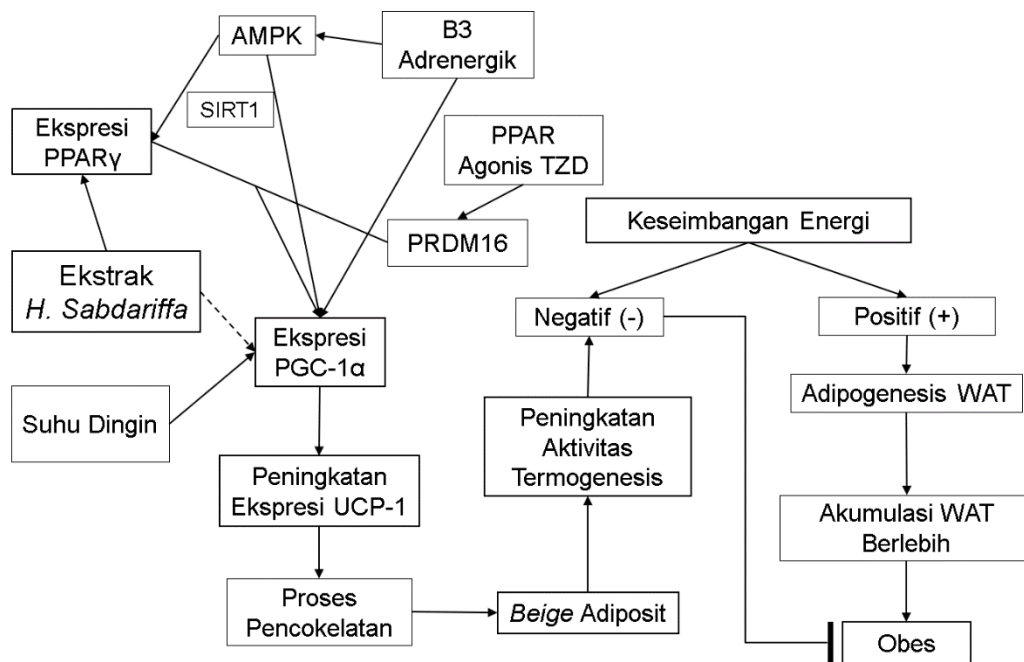
#### 1.5.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui pengaruh pemberian *H. sabdariffa* terhadap ekspresi PPAR $\gamma$  tikus obes dengan pemberian dosis 200mg/KgBB/hari dan 400mg/KgBB/hari.
2. Mengetahui pengaruh pemberian *H. sabdariffa* terhadap ekspresi PGC-1 $\alpha$  tikus obes dengan pemberian dosis 200mg/KgBB/hari dan 400mg/KgBB/hari.
3. Mengetahui pengaruh pemberian *H. sabdariffa* terhadap indeks Lee pada tikus obes.

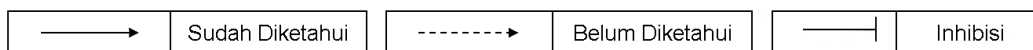
### 1.6 Manfaat Penelitian

1. Penelitian ini diharapkan dapat menemukan mekanisme H sabdariffa dalam menurunkan berat badan melalui proses pencoklatan yang diregulasi oleh PPAR $\gamma$  dan PGC1 $\alpha$
2. Penelitian ini dapat dimanfaatkan sebagai upaya penanganan obesitas berbasis bahan herbal
3. Penelitian ini dapat di kembangkan melalui uji klinik agar menjadi bahan herbal terstandarisasi.

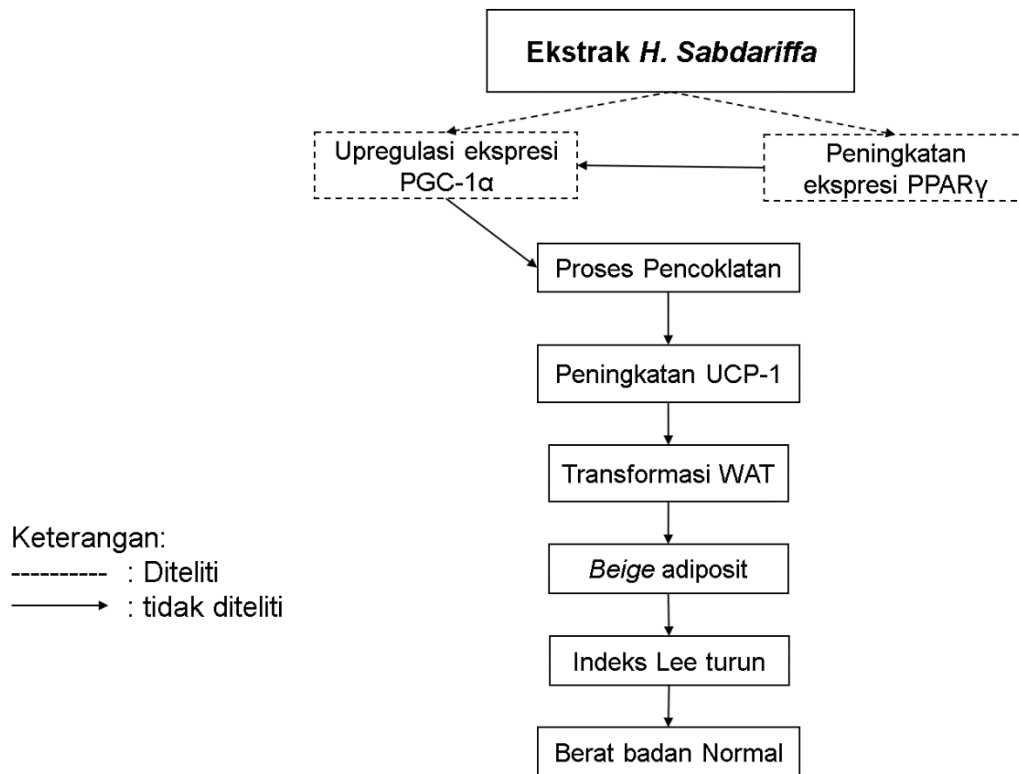
### 1.7 Kerangka Teori



Ket:



## 1.8 Kerangka Konsep



## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Obesitas

Berdasarkan data *World Health Organization* (WHO), Secara global penderita obes meningkat sebanyak dua kali lipat sejak tahun 2000 hingga 2016. Pada tahun 2000 penderita obes sebanyak 8,7 persen, sedangkan pada tahun 2016, naik menjadi 13,1 persen.<sup>1</sup> Sebanyak 1,9 miliar dan 650 juta orang dewasa berusia lebih dari 18 tahun mengalami kelebihan berat badan dan obesitas pada tahun 2016.<sup>2</sup> Berdasarkan data Riset Kesehatan Dasar tahun 2018 di Indonesia, yaitu pada tahun 2018, prevalensi berat badan lebih sebesar 13,6 persen lebih tinggi dari tahun 2007 sebesar 8,6 persen, sedangkan prevalensi obesitas pada tahun 2018 sebesar 21,8 persen, meningkat dua kali lipat dibandingkan pada tahun 2007 sebesar 10,5 persen.<sup>4</sup>

Tidak seimbangnya asupan energi dengan pemakaian energi menyebabkan obesitas.<sup>5,6</sup> Obesitas memiliki karakteristik berupa peningkatan masa lemak dan berat badan.<sup>7</sup> Obesitas dapat diketahui dengan menghitung nilai IMT (Index Massa Tubuh) dengan nilai bervariasi tergantung ras.<sup>25,26</sup>

Untuk mengetahui BMI (Body Mass Index) atau IMT Digunakan perhitungan dengan menggunakan rumus  $BMI = \text{Kg}/\text{m}^2$ . Dari hasil perhitungan berdasarkan rumus tersebut, WHO mengklasifikasikan obesitas menjadi beberapa kategori dari *underweight*, *normal*, *overweight*, *obese* yang dapat dilihat pada **Tabel 1**.<sup>25,26</sup> Indikator obesitas yang digunakan oleh Riskesdas adalah untuk berat badan lebih pada dewasa yaitu  $IMT \geq 25,0$  sampai dengan  $< 27,0$  dan untuk obesitas dengan  $IMT \geq 27,0$ .<sup>4</sup>

**Tabel 1. Klasifikasi obesitas berdasarkan WHO yang diadopsi dari WHO 1995, WHO 2000, WHO 2004.**<sup>25,26</sup>

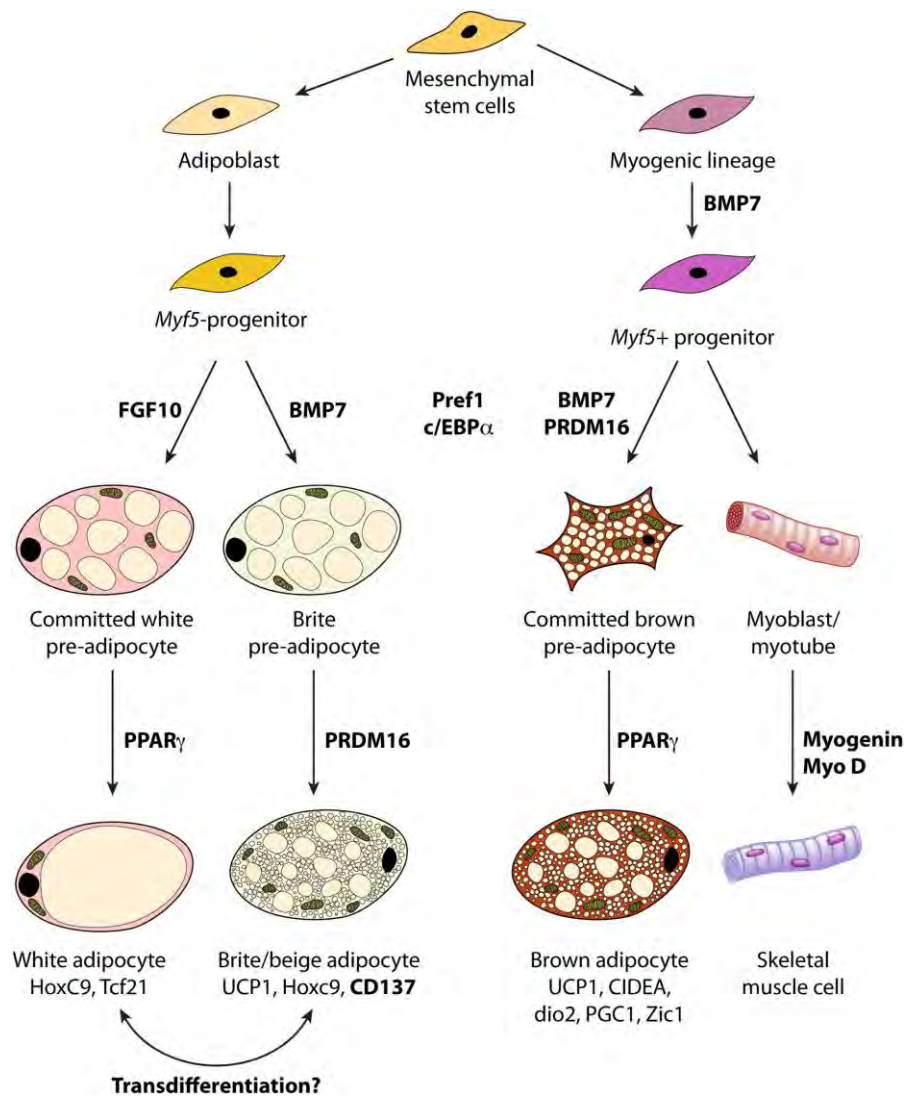
Klasifikasi	Indeks Masa Tubuh ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	
	<i>Principal cut-off points</i>	<i>Additional cut-off points</i>
Berat Badan Kurang	<b>&lt;18.50</b>	<b>&lt;18.50</b>
<i>Severe thinness</i>	<16.00	<16.00
<i>Moderate thinness</i>	16.00 - 16.99	16.00 - 16.99
<i>Mild thinness</i>	17.00 - 18.49	17.00 - 18.49

Normal	<b>18.50 - 24.99</b>	<b>18.50 - 22.99</b> <b>23.00 - 24.99</b>
Berat Badan Lebih	<b>≥25.00</b>	<b>≥25.00</b>
<b>Pra-obes</b>	25.00 - 29.99	25.00 - 27.49 27.50 - 29.99
Obes	<b>≥30.00</b>	<b>≥30.00</b>
<b>Obes Kelas 1</b>	30.00 - 34.99	30.00 - 32.49 32.50 - 34.99
<b>Obes Kelas II</b>	35.00 - 39.99	35.00 - 37.49 37.50 - 39.99
<b>Obes Kelas III</b>	≥40.00	≥40.00

Obesitas dapat menimbulkan berbagai penyakit seperti penyakit kardiovaskuler, diabetes, gangguan muskuloskeletal (Osteoarthritis), *polycystic ovarian syndrome*, hipertensi.<sup>2,3</sup> Dengan demikian perlu penanganan yang optimal. Salah satu penanganan obesitas yang mutakhir adalah proses pencoklatan.

## 2.2 Mekanisme Pencoklatan

Proses pencoklatan adalah proses perubahan jaringan adiposa putih (WAT) berubah menjadi jaringan adiposa *beige* / *beige* adiposit. Beberapa tipe jaringan adiposa yaitu sel adiposit coklat, adiposit putih, adiposit *beige* yang berdiferensiasi dari stem sel mesenkim. Sel mesenkim dapat berdiferensiasi menjadi adipoblast. Adipoblast yang tidak memiliki Myf5 progenitor berkembang menjadi adiposit putih dan *beige* adiposit. Sedangkan myogenik yang memiliki Myf5+ progenitor berdiferensiasi menjadi adiposit coklat. Semua proses diferensiasi sel yang berasal dari sel mesenkim hingga menjadi sel yang matang dipengaruhi oleh faktor transkripsi lain seperti FGF10, BMP7, c/EBP $\alpha$ , PRDM16, PPAR $\gamma$ , Myogenin, Myo D, HoxC9, UCP1, PGC1 $\alpha$ , dan Zic1. (Gambar 1).<sup>27,28</sup>

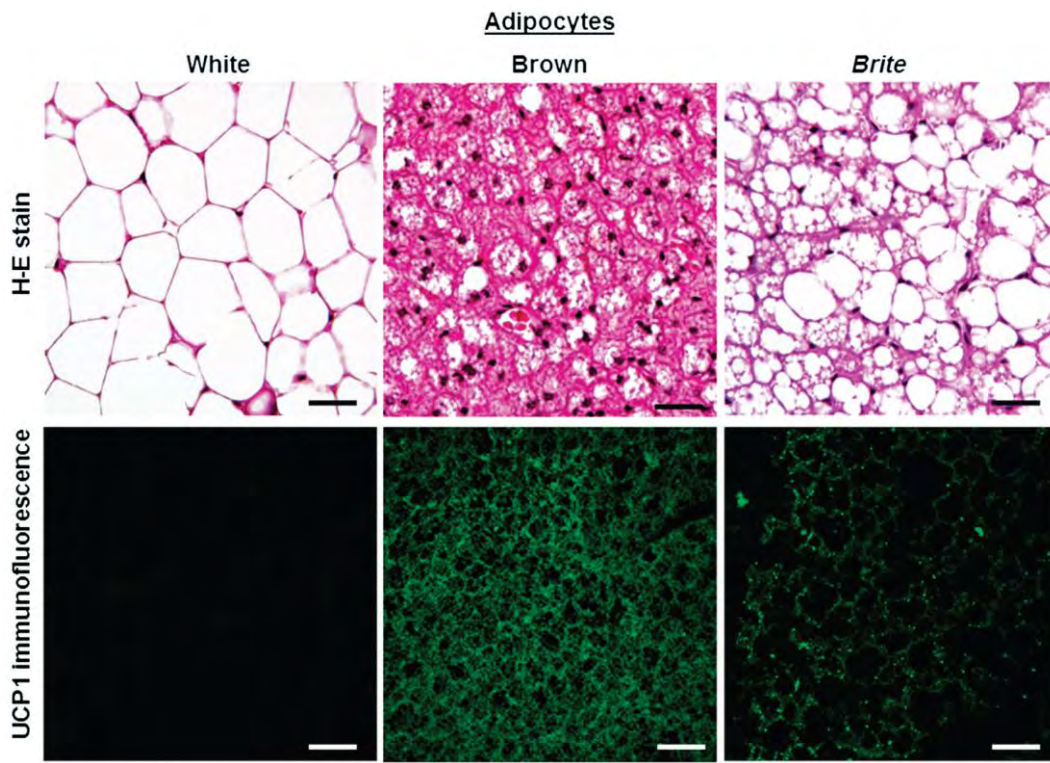


**Gambar 1. Diferensiasi adiposit putih, adiposit coklat, adiposit *beige* dan miosit.<sup>27,28</sup>**

Berdasarkan lokasinya, jaringan adiposa WAT yang paling banyak ditemukan pada hampir seluruh tubuh manusia. Adiposa coklat pada umumnya ditemukan pada supraclavicular, paravertebral, dan mediastinal. *Beige* adiposit ditemukan tersebar diantara adiposa putih. Selain lokasi, terdapat juga perbedaan karakteristik dari adiposit putih, coklat, dan *beige*. Sel adiposit putih berbentuk bola bulat, terisi penuh sebuah lipid droplet, dan mengandung sedikit mitokondria. Ukuran adiposa coklat biasanya lebih kecil dari yang putih dan *beige*, serta mengandung sejumlah besar mitokondria dan beberapa *lipid droplets* berukuran kecil dan UCP1. Sedangkan *beige* adiposit, memiliki karakteristik menyerupai adiposa coklat dengan ukuran sel lebih besar dari adiposa coklat, serta memiliki



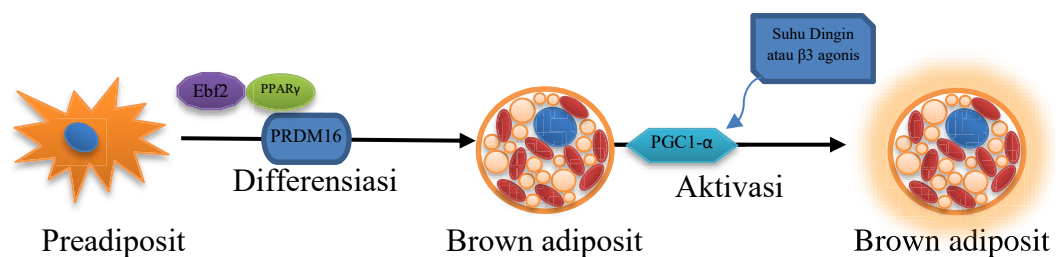
beberapa lipid droplet yang memiliki ukuran lebih besar dari adiposit coklat dan banyak mengandung UCP1 (Gambar 2).<sup>11,29-31</sup>



**Gambar 2.** Morfologi dari tiga adiposit berbeda, kiri WAT, tengah BAT, kanan Beige. Pewarnaan Hematoxylin dan eosin, serta immunofluorescence yang ditandai menggunakan *anti-uncoupling protein* (UCP) 1 antibody, ukuran bar pada gambar berukuran 50  $\mu\text{m}$ .<sup>11,30</sup>

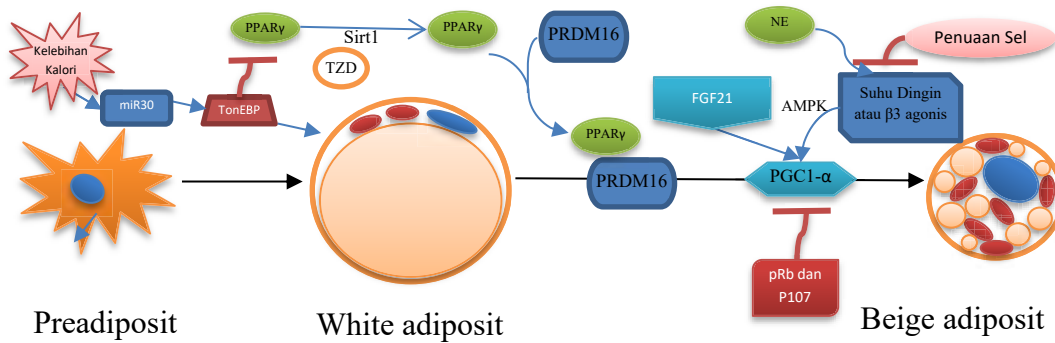
Proses diferensiasi pada jaringan adiposa BAT diawali dengan Early B cell factor-2 (EBF2) bekerja sama dengan PPAR- $\gamma$  untuk mempromosikan ekspresi Prdm16, yang mendorong diferensiasi sel dari sel progenitor Myf5<sup>+</sup> menjadi adiposit coklat / BAT. Suhu dingin atau agonis  $\beta_3$  yang dilepaskan oleh Norepinefrin (NE) mengaktifasi peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (Pgc1 $\alpha$ ) menjadi adiposit coklat yang aktif melalui kerja UCP1. Dimana Pgc1 $\alpha$  berperan dalam biogenesis mitokondria sel. Adiposit coklat yang memiliki mitokondria yang banyak, menjadi aktif sehingga meningkatkan thermogenesis (Gambar 3).<sup>32-37</sup>

Thermogenesis juga di stimulasi oleh sistem saraf simpatis dan paparan suhu dingin.<sup>30,33</sup> Stimulasi simpatis akan meningkatkan lipolisis dan  $\beta$ -oksidasi. Energi oksidasi substrat kemudian diubah menjadi panas.<sup>29</sup> Proses pencoklatan dapat meningkatkan ekspresi UCP 1. Proses pencoklatan tersebut di induksi oleh beberapa faktor seperti paparan dingin, latihan fisik, hormon endokrin, obat-obatan, asam empedu,  $\beta$ 3-adrenergik, dan pola makan berupa *intermittent fasting*.<sup>28,36,38-41</sup> Namun Profil thermogenik dari *beige adiposit* bersifat reversibel.



**Gambar 3. Regulasi perkembangan BAT.** <sup>32-35</sup>

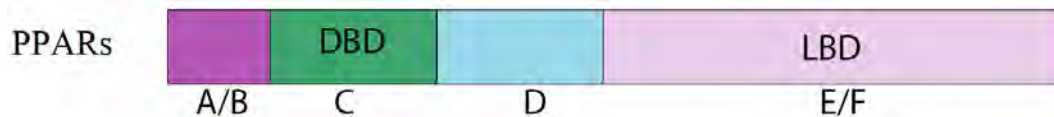
Proses pencoklatan juga dipengaruhi oleh miR30 yang jumlahnya meningkat ketika terjadi keadaan kalori berlebih, yang selanjutnya mencetuskan peningkatan *Tonicity-responsive enhancer binding protein* (TonEBP), yang kerjanya menghambat ekspresi peroxisome proliferasi-activated receptor-2 (PPAR $\gamma$ 2), sedangkan penurunan TonEBP meningkatkan proses pencoklatan.<sup>42</sup> Penelitian yang dilakukan oleh Berry dkk (2017) membuktikan bahwa penuaan sel memengaruhi proses pencoklatan, penuaan sel yang disebabkan oleh modifikasi genetik maupun induksi oleh obat (tamoxifen) dapat menghalangi *cold-induced beiging*.<sup>43</sup> Selain itu agonis thiazolidinediones (TZD) dari PPAR $\gamma$  mempromosikan pencoklatan baik dengan meningkatkan stabilitas PRDM16 dan melalui Sirt1-dependent deacetylation dari PPAR $\gamma$ , yang merekrut PRDM16 ke PPAR $\gamma$  gen target (Gambar 4).<sup>14,32-35</sup>



Gambar 4. Regulasi transkripsi perkembangan *beige* adiposit.

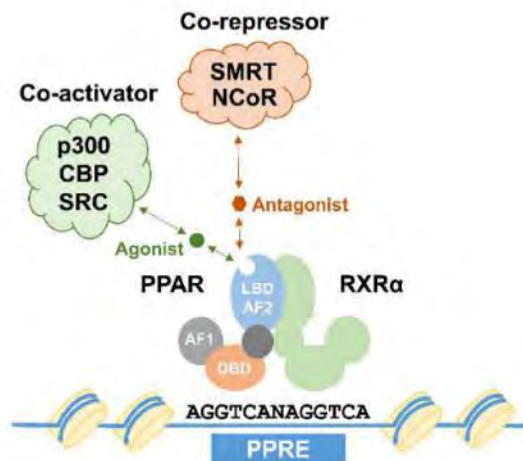
### 2.3 Peroxisome Proliferator Activated Receptors (PPARs)

*Peroxisome Proliferator Activated Receptors* merupakan salah satu jenis dari reseptor nukleus, yang umumnya bekerja sebagai *ligand activated transcription factors*. PPARs dianggap sebagai *master regulator* glukosa, asam lemak dan metabolisme lipoprotein, keseimbangan energi, proliferasi sel, diferensiasi sel, peradangan, adipogenesis, dan resistensi insulin.<sup>44,45</sup> Secara umum struktur PPARs terdiri dari 4 domain A/B, C, D, dan E/F (seperti yang dapat dilihat pada Gambar 5).<sup>44</sup>



Gambar 5. Struktur PPARs.<sup>44</sup>

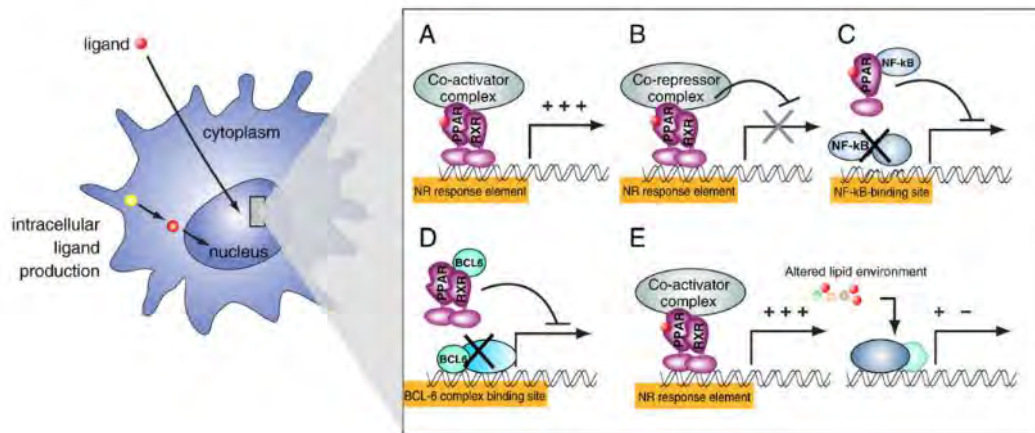
PPARs membentuk heterodimer dengan pasangan obligat mereka yang merupakan anggota subfamili reseptor inti (*nuclear receptors*) lain, RXRs (terdapat 3 subtype yaitu RXR $\alpha$ , RXR $\beta$  dan RXR $\gamma$ ).<sup>46,47</sup>



**Gambar 6. Regulasi transkripsi oleh protein PPAR.<sup>48</sup>**

Beberapa mekanisme regulasi genetik dari PPARs (Gambar 7) sebagai berikut:<sup>49,50</sup>

- Setelah mengikat ligand, PPARs menginduksi ekspresi gen. Bagian induksi, yang ditunjukkan di sini, adalah hasil dari pengaturan langsung ekspresi gen oleh trans-aktivasi. Ligand PPARs / RXR heterodimer merekrut molekul co-activator ke promotor yang mengandung elemen respon PPAR dan kemudian mengaktifkan ekspresi gen.
- Bagian gen target langsung ditekan oleh PPARs dengan adanya ligand. Namun, sebagian besar regulasi transkripsi yang dimediasi PPARs mengakibatkan aktivasi.
- Ligand dependent trans-repression* oleh PPARs. Setelah mengikat ligand, PPARs dapat mengganggu aktivitas faktor transkripsi yang berbeda, seperti NF- $\kappa$ B, melalui interaksi protein-protein.
- Ligand transrepression independen*. PPARs yang tidak berpasangan dengan ligand (*unliganded* PPARs) dapat mengikat dan menyita faktor transkripsi sehingga menghalangi aktivitas mereka. Contohnya adalah pengikatan BCL-6 oleh *unliganded* PPAR $\beta/\delta$ .
- PPARs mengubah homeostasis lipid sistemik yang dapat memengaruhi regulasi gen melalui faktor transkripsi yang tidak terkait.



**Gambar 7. Mekanisme regulasi genetik oleh PPARs.<sup>49</sup>**

Klasifikasi Peroxisome Proliferator Activated Receptors (PPARs) yaitu

### 2.3.1 PPAR $\alpha$

Peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  PPAR $\alpha$  diekspresikan terutama di hati, selain itu juga diekspresikan pada miosit jantung, sel epitel tubular proksimal ginjal, otot skelet, epitel usus besar, sel otot polos dan endotel, serta sel imun termasuk makrofag, limfosit, adiposa coklat dan granulosit.<sup>45,49</sup> Diketahui juga pada penelitian *in vivo* dan *in vitro* bahwa PPAR $\alpha$  berperan dalam metabolisme lipid dan lipoprotein. Pada keadaan puasa PPAR $\alpha$  diaktifkan oleh asam lemak yang berasal dari adiposa sehingga meningkatkan badan keton melalui oksidasi asam lemak dalam hati dan sel mononuklear darah perifer.<sup>46</sup> PPAR $\alpha$  diaktivasi pada keadaan kekurangan energi, dan merupakan bagian dari respons adaptif pada keadaan puasa, dan kontribusinya meningkatkan produksi ATP dari  *$\beta$ -oxidative phosphorylation*, proses yang berkaitan dengan transportasi asam lemak dan ketogenesis.

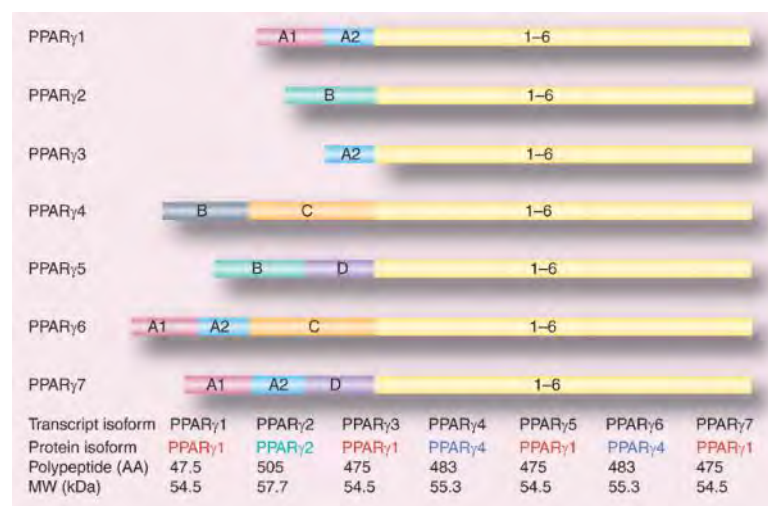
### 2.3.2 PPAR $\beta/\delta$

Peroxisome proliferator-activated receptor- $\delta/\beta$  (PPAR $\delta/\beta$ ) diekspresikan tinggi pada usus besar, usus kecil, hati dan keratinosit, dan juga ditemukan pada adiposit, makrofag, paru-paru, dan otak. PPAR $\delta/\beta$  juga memiliki peran sebagai meningkatkan metabolisme asam lemak dan menekan inflamasi makrofag.

Senyawa sintesis seperti GW501516, GW610742, dan GW0742X memiliki selektivitas tinggi terhadap PPAR $\delta$ . PPAR- $\delta$  juga dapat menurunkan ekspresi mediator inflamasi dan molekul adhesi, sehingga sangat potensial dalam menghambat proses atherogenesis.<sup>46,49,51</sup>

### 2.3.3 PPAR $\gamma$

Peroxisome proliferasi-aktivasi reseptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) diekspresikan pada berbagai macam organ, seperti limpa, otot rangka, pankreas, hepar, adiposa putih, otak, adiposa coklat, tulang, ginjal, jantung, makrofag, sel T regulator, dan sel dendritik. Pada kromosom PPAR $\gamma$  berada pada lokasi 3p25. Diketahui PPAR $\gamma$  terdapat 7 isoform *transcript* PPAR yang menghasilkan 3 jenis produk protein dari PPAR $\gamma$  (Gambar 8). PPAR $\gamma$ 1 diekspresikan pada hampir semua jaringan, termasuk jantung, otot, usus, ginjal, pankreas, dan limpa. PPAR $\gamma$ 2 diekspresikan terutama pada jaringan adiposa. PPAR $\gamma$ 3 diekspresikan pada makrofag, usus besar, dan jaringan adiposa putih. PPAR $\gamma$ 4 diekspresikan pada sel endotel, PPAR $\gamma$ 5 diekspresikan pada makrofag diekspresikan pada makrofag, PPAR $\gamma$ 6 diekspresikan pada makrofag and jaringan adiposa, PPAR $\gamma$ 7 diekspresikan pada makrofag and jaringan adiposa.<sup>44,46,52,53</sup>



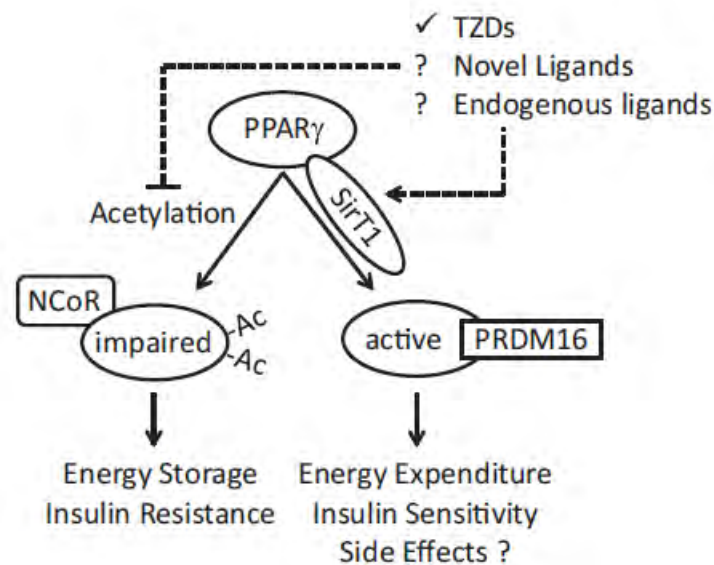
**Gambar 8. Isoform struktur PPAR.**<sup>44</sup>



PPAR $\gamma$  berperan dalam penanganan obesitas, melalui menghambat proses adipogenesis adiposit putih (WAT), PRDM16 berinteraksi dengan CtBP1 atau CtBP2 dan C/EBP $\alpha$ , yang akhirnya menekan ekspresi gen WAT.<sup>54</sup>

PPAR $\gamma$  juga bertindak terutama sebagai pengatur utama gen metabolik, dan meningkatkan sensitivitas insulin melalui pengambilan dan penyimpanan glukosa/lipid di jaringan perifer, seperti otot rangka, hati, dan jaringan adiposa. PPAR $\gamma$  juga diperlukan untuk diferensiasi sel lemak. Ekspresi berlebih PPAR $\gamma$  dapat mengubah fibroblas dan sel mesenkim menjadi adiposit putih, sedangkan mutan PPAR $\gamma$  negatif pada preadiposit menghambat adipogenesis. Pada tikus PPAR $\gamma$  knock-out (tetraploid atau *chimeric PPAR $\gamma$  null mice*) terjadi kegagalan membentuk jaringan adiposa sehingga tidak terbentuk jaringan adiposa putih ataupun coklat.<sup>51,55-57</sup>

Proses pencoklatan membutuhkan PPAR $\gamma$  pada prosesnya, PPAR $\gamma$  memiliki peran mempromosikan dan menstabilkan PRDM16 agar proses pencoklatan dapat bekerja dengan baik.<sup>33,34</sup> PPAR $\gamma$  merupakan faktor transkripsi wajib yang sangat diperlukan untuk differensiasi dan kelangsungan hidup WAT dan BAT. Salah satu obat yang sering digunakan untuk penelitian dalam mengatasi obesitas merupakan agonis PPAR $\gamma$  merupakan golongan TZD yaitu rosiglitazone dan pioglitazone.<sup>32,44,58</sup> Thiazolidinedione (TZD) meningkatkan asosiasi antara PPAR $\gamma$  dengan Sirt1, sehingga mempromosikan deasetilasi PPAR $\gamma$ . Deasetilasi PPAR $\gamma$  oleh SirT1, atau mutasi acetylated dalam PPAR $\gamma$  mencetuskan disosiasi dari NCoR corepressor dan menyebabkan terjadi asosiasi dengan Prdm16. Kondisi ini mencetuskan proses pencoklatan adiposit putih subkutan dengan merangsang mereka untuk mengadopsi profil ekspresi gen jaringan adiposa coklat, yang menghasilkan peningkatan pengeluaran energi pada jaringan adiposa putih, hal ini dapat dilihat pada **Gambar 9**.<sup>59</sup>



**Gambar 9. PPAR $\gamma$  mengaktivasi pemakaian energi.<sup>59</sup>**

Lasar dkk, 2018 menyatakan antara berbagai macam tikus yang telah dihilangkan PPAR $\alpha$ ,  $\beta/\delta$ , and  $\gamma$ , diketahui bahwa PPAR $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  dapat dibuang (*dispensable*) untuk menjaga fungsi lemak coklat. Pada tikus dengan ablasi PPAR $\gamma$  dapat menurunkan kapasitas thermogenik serta dapat menurunkan kemampuan induksi oleh sinyal  $\beta$ -adrenergik pada adiposit coklat baik secara *invivo* dan *invitro*, serta pergeseran dari metabolisme asam lemak oksidatif ke pemanfaatan glukosa.<sup>60,61</sup>

#### 2.4 Peroxisome proliferasi-aktivasi reseptor gamma koaktivator 1-alpha (Pgc-1 $\alpha$ )

Peroxisome proliferasi-aktivasi reseptor gamma koaktivator 1-alpha (PGC-1 $\alpha$ ) bekerja sebagai koaktivator PPAR $\gamma$ , mengatur biogenesis mitokondria dan respirasi sel melalui induksi uncoupling protein dan regulasi respirasi faktor inti sel yang banyak ditemukan pada *beige* adiposit dan BAT.<sup>62</sup> PGC1 $\alpha$  diinduksi oleh suhu dingin, puasa, dan olah raga serta fungsi thermogenesis adaptif. Ini dibutuhkan dalam proses thermogenesis BAT bukan differensiasi. Peningkatan ekspresi gen UCP1 mengarah pada fenotip BAT, pada kondisi kekurangan PGC-1 $\alpha$  ekspresi gen thermogenik dan mitokondria rendah seperti pada jaringan WAT. Selain itu juga PGC1 $\alpha$  juga diperlukan pada metabolisme glukosa dan lemak pada



tikus obes, kondisi PGC1 $\alpha$  yang rusak diketahui dapat memengaruhi terjadinya peningkatan resistensi insulin dan diabetes tipe 2 pada manusia.<sup>35,54,63</sup>

Mitokondria menghasilkan panas yang dipengaruhi oleh ekspresi UCP1 melalui sebuah mekanisme yang disebut "kebocoran proton / *protein leakage*". Proton bocor dari ruang intermembrane ke matriks menghasilkan panas dibandingkan energi, UCP1 yang berada pada membran dalam mitokondria bekerja sebagai protein transmembran memperbolehkan proton untuk masuk kembali ke matrix mitokondria menyebabkan gradien elektrokimia menurun sehingga mendorong sintesis ATP dan meningkatkan produksi panas.<sup>29,63</sup>

Ekspresi PGC-1 $\alpha$  di regulasi oleh pRb (retinoblastoma protein) dan keluarga Rb p107. WAT pada tikus p107 menunjukkan fitur seperti BAT: ada banyaknya adiposit multilokular dengan peningkatan PGC-1 $\alpha$  dan ekspresi UCP-1. pRb diturunkan pada p107, pRb dapat menekan ekspresi PGC-1 $\alpha$  dengan berikatan pada promoternya, baik pRb dan p107 cenderung menjadi regulator negatif dari proses pencoklatan karena efeknya pada PGC-1 $\alpha$ . Sebaliknya, FGF21 meningkatkan protein PGC-1 $\alpha$  pada WAT dan memberikan efek positif dalam proses pencoklatan (*Gambar 4*).<sup>54</sup>

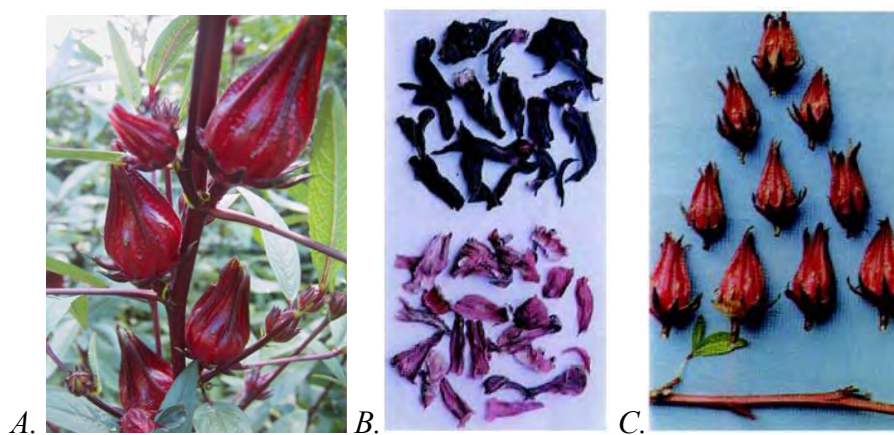
AMP-activated protein kinase (AMPK) meregulasi homeostasis energi melalui fosforilasi dari berbagai substrat, salah satu peran AMPK meregulasi biogenesis dan fungsi mitokondria melalui induksi proliferasi-activated receptor gamma coactivator 1  $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ ).<sup>64,65</sup> Peningkatan PGC1 $\alpha$  yang selanjutnya memengaruhi UCP1 sehingga terjadi thermogenesis yang menyebabkan peningkatan pemakaian energi menjadi panas.

Aktivitas fisik dapat meningkatkan aktivitas PGC1 $\alpha$ , Proses ini diharapkan dapat diatasi menggunakan tanaman herbal, salah satunya *H. sabdariffa* yang sudah diketahui dapat mengatasi obesitas, walau jalurnya belum banyak diketahui.

## 2.5 Hibiscuss Sabdariffa Linn.

*Hibiscus sabdariffa* atau *H. sabdariffa* ialah tanaman dikotil dengan karakteristik sebagai berikut: tanaman kayu, semak belukar, tumbuh setinggi 2-2,5 meter, daun berlobus 3-5, panjang 8-15cm, bunga berdiameter 8-10cm, memiliki

kelopak tebal di dasar bunga, dengan lebar 1-2 cm berwarna merah terang. *H. sabdariffa* Linn dikenal juga dengan (Gambar 10) adalah rosella, sorrel, Gongura, Lalambari, Polechi, Pulichchai (Malayalam), Pulachakiri, Pundibija (Kannada), Pulichchai Keerai (Tamil), Patwa (Hindhi) Lal-mista, Lal-ambadi (Marathi), Chukar (Bengali), Yerra gogu (Telugu), and Chukkiar (Assam). Tanaman ini banyak tumbuh di daerah tropis seperti Karibia, Central America, India, Africa, Brazil, Australia, Hawaii, Florida, Filipina. Terdapat 2 jenis varietas rosella yaitu white roselle dan red roselle.<sup>5,20,22,66,67</sup>



**Gambar 10. *Hibiscus Sabdariffa* Linn. (rosella). A. Tanaman rosella, B. kaliks kering, C. kaliks segar yang baru dipanen.**<sup>5,20,68</sup>

Pada pengobatan tradisional, rosella digunakan sebagai antidotum bahan kimia beracun (asam, basa dan pestisida) serta jamur beracun, antiseptic, antifungal, laxative ringan, aphrodisiac, astringent, cholagogue, demulcent, penyakit gangguan pencernaan, mengatasi batu ginjal, kerusakan hepar dan menurunkan viskositas darah. Pada bagian daun berguna sebagai antiscorbutic, omollient, diuretic, refrigerant, sedative, hypolipidemic, anti-obesity, serta angio- dan *cardio-protective*.<sup>5,67,69</sup>

Komposisi kimia yang ada pada bagian tanaman rosella (**Tabel 2**). Kandungan fenol pada tanaman mengandung anthocyanin seperti sambubioside, cyanidin-3-sambubioside, dan delphinidin-3-glucoside; flavonoid lain seperti hibiscetin, gossypetin, dan glycoside lain; sterols like  $\beta$ -sitoesterol, eugenol, ergoesterol, dan protocatechuic acid.<sup>66</sup>

Ekstraks kaliks Roselle merupakan sumber antioksidan yang baik dalam bentuk anthocyanin. Anthocyanin adalah satu tipe dari komponen flavonoid yang ada di kaliks, petal / mahkota. Selain itu efek antioksidan kuat diketahui juga terdapat pada bagian ekstrak biji, bunga, daun dan batang. Pemeriksaan phytochemical (fitokimia) menunjukkan tanaman ini kaya akan antioksidan seperti senyawa polifenol. Peran polifenol yaitu mencegah banyak penyakit kronis seperti gangguan kardiovaskular, diabetes, kanker, atau gangguan neurodegeneratif yang patogenesisnya dan progresivitasnya berkaitan dengan aksi radikal bebas.<sup>66</sup>

Ekstrak *H. sabdariffa* memiliki efek radikal bebas dan pembersihan oksigen reaktif, menghambat kerja *xanthine oxidase*, menunjukkan efek perlindungan melawan *ter-butylhydroperoxide* (t-BHP)-*induced oxidative damage*, melindungi kerusakan sel dengan peroksidasi lipid, menghambat oksidasi Cu<sup>2+</sup>-mediated dari LDL dan pembentukan asam thiobarbiturat (*thiobarbituric acid reactive substances* /TBARs), menghambat pembentukan kandungan malondialdehida, mengurangi kehabisan glutathione, meningkatkan fungsi hepar dan menurunkan aktivitas superoksida dismutase dan katalase darah.<sup>5</sup>

Polifenol merupakan bioaktif phytochemical yang diketahui sebagai antiinflamasi.<sup>7</sup> Mardiah (2015) menyatakan bahwa inflamasi merupakan respon fisiologi tubuh terhadap kerusakan dan gangguan faktor eksternal. Salah satunya adalah hiperglikemia mencetuskan respons inflamasi yang dimediasi oleh sitokin. Keadaan hiperglikemia mencetuskan inflamasi ditandai dengan peningkatan penanda inflamasi seperti *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ), *high sensitivity C reactive protein* (hs-CRP), *interleukin-6* (IL-6), dan *interleukin-18* (IL-18). Terjadi peningkatan *reactive oxygen species* (ROS) juga pada diabetes mellitus. ROS mengaktifasi NF- $\kappa$ B yang merupakan faktor transkripsi yang mengatur ekspresi gen pro inflamasi seperti TNF $\alpha$ , C reactive protein dan IL-6. Hasil penelitiannya menunjukkan ekstrak rosella menurunkan radikal bebas dan TNF $\alpha$ .<sup>70</sup> Pada jurnal Mileo (2019) menunjukkan polyphenol pada *olive oil*, *green tea*, menurunkan inflamasi ditunjukkan dengan turunnya NF- $\kappa$ B, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-6.<sup>71</sup> Rodriguez-Ramiro menunjukkan polyphenol menurunkan inflamasi dengan cara menurunkan JNK, NF- $\kappa$ B, PKC, mTOR yang berperan dalam proses inflamasi.<sup>72</sup>

Tabel 2. Fitokimia dari rosella.<sup>20,73</sup>

Bagian tanaman	Komposisi kimia
Bunga	Cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-sambubioside, tartaric acid, xylose, karbohidrat, lemak, proteins, fibre (diety), fibre (crude), delphinidin-3- sambubioside, delphinidin-3-glucoside, delphinidin-3-xyloglucoside, delphinidin, rhamnogalacturans, arabinans, sucrose, mannose, mucilage, thiamin, pectin, niacin, $\beta$ -carotene, arabinogalactans, riboflavin, phytosterols, citric acid, maleic acid, ascorbic acid, fruit acids, malic acid, alhydroxycitric-acid, hibiscic acid, oxalic acid, (+)-allooxycitronic acid-lactone, glycolic acid, utalonic acid, protocatechuic acid, cyanidin-3-xyloglucoside, delphinin, gossypetin-3-glucoside, gossypetin, hibiscin, hibiscetin, hibiscitrin, sabdaretin, resin, sabdaritrin, mineral dan debu.
Biji	Cellulose, kolesterol, starch, carbohydrates, ergosterol, campesterol, propionic acid, $\beta$ -sitosterol, pelargonic acid, pentosans, palmitic acid, palmitoleic acid, myristic acid, oleic acid, malvalic acid, methanol, sterculic acid, linoleic acid, formic acid, caprylic acid, 12,13-epoxy-cis-9-octadecenoic acid, stearic acid, isoamyl alcohol, cis- isopropyl alcohol, 3-methyl-1- butanol, ethanol, fiber dan mineral.
Daun	Anisaldehyde, $\alpha$ -Terpinyl acetate, $\beta$ - sitosterol, $\beta$ -carotene, $\beta$ -sitosteryl benzoate, $\beta$ -D-galactoside, niacin, lemak, iso-propyl alcohol, isoamyl alcohol, 3-methyl-1-butanol, methanol, ethanol, benzyl alcohol, fibre, malic acid dan debu.
Buah	Ascorbic acid, $\alpha$ -Terpinyl acetate, calcium oxalate, pectin, caprylic acid, anisaldehyde, acetic acid, citric acid, formic acid, ethanol, propionic acid, pelargonic acid, methanol, isopropyl alcohol, 3-methyl-1- butanol, benzaldehyde, benzyl alcohol, dan mineral.
Akar	Saponin dan Tartaric acid

Secara invitro sudah diketahui efek antioksidan kuat menggunakan ekstrak biji, bunga, daun dan batang. Pemeriksaan phytochemical (fitokimia) menunjukkan tanaman ini kaya akan antioksidan seperti senyawa fenol, anthocyanin, flavonol, asam protocatechuic, alkaloid, anthocyanin, tannin, flavonoid termasuk quercetin dan rutin, serta saponin.<sup>5,67</sup> Selain senyawa tadi, juga kaya akan asam organik seperti hydroxycitric acid, hibiscus acid, hibiscus acid glucoside dan hibiscus acid 6-methyl ester.<sup>5</sup>

Komposisi lain dari *H. sabdariffa* adalah kalsium, aluminum, tembaga, chromium, organic acid, besi, pectins, polysaccharides, dan senyawa polyphenol,

seperti thiamine,  $\beta$ -carotene, niacin, riboflavin, dan ascorbic, *hibiscic acids* dan malic, selain itu juga mengandung vitamin E, prekursor glutathione.<sup>67,74</sup>

Kandungan vitamin C dan fenol banyak terkandung pada rosella merah. Peran dari kandungan antioksidan dari rosella merah yang merupakan vitamin C dan senyawa fenol adalah melindungi dari peroksidase lipid pankreas.<sup>66</sup> Anthocyanin seperti cyanidin-3-sambubioside dan delphindin-3-sambubioside merupakan komponen utama di ekstrak *H. sabdariffa*. Cyanidin-3-O- $\beta$ -glukosida (C3G) menekan perkembangan obesitas akibat HFD pada tikus dan diet C3G yang murni meningkatkan sensitivitas insulin dan menurunkan kadar glukosa darah mencit diabetes tipe 2.<sup>74</sup>

Polifenol merupakan bioaktif phytochemical yang diketahui sebagai antioksidan yang efektif sebagai antiinflamasi, antialergi, hepatoprotektif, antithrombotik, antiviral, dan antikarsinogenik. Phytochemical lain yang juga ditemukan pada rosella yaitu saponin dan flavonoid pada kaliks dari varietas rosella.<sup>7,66</sup> Serum Kolesterol Total, TG, asam lemak bebas (*free fatty acid*), high density lipoprotein (HDL), dan kadar gula darah dari diet tinggi lemak (*High fat diet/HFD*) dapat diregulasi, dengan polifenol yang didapat dari berbagai sumber.<sup>7,74</sup> Sebagai tambahan banyak polifenol menunjukkan efek hepatoprotektif dalam *drug induced hepatic necrosis* dan kolestatic liver injury pada pengerat.<sup>7</sup>

Pada studi hewan *in vivo* yang mengalami *non alcoholic fatty liver disease* (NAFLD), penggunaan polyphenol extract *H. sabdariffa* telah menunjukkan turunya kadar insulin. Pemberian polyphenol extract of *H. sabdariffa linn* dengan kadar 22mg/kg/hari selama 10 minggu, membuat turunya berat badan, TAG, steatosis, ukuran adiposit di jaringan adiposit, turunya miR-103, miR-107, meningkatnya miR-122 (pada liver), turunya FAS, meningkatnya kadar protein p-AMPK, menurunnya ekspresi gene Sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1c), dan akumulasi Q3 G dalam sel dan jaringan.<sup>7,72</sup> Ekstrak *H. sabdariffa* sudah diketahui mengandung banyak antioksidan seperti polyphenolic dan flavonoid, yang dapat menurunkan oxysterol dalam metabolisme asam empedu dan menghalangi akumulasi lipid di hepar yang berasal dari garam empedu. Ekstrak *H. sabdariffa* dapat menurunkan kadar kolesterol plasma dan organ. Konsumsi harian

dari ekstrak *H. sabdariffa* dapat menurunkan berat badan, BMI dan lemak tubuh, serta menurunkan distribusi lemak abdomen pada manusia.<sup>7</sup> Efek antiobesitas juga ditunjukkan pada pemberian ekstrak *H. sabdariffa* *in vivo* pada umumnya dengan toksisitas sangat rendah, dengan dosis maksimal sekitar 2000 mg/kgBB.<sup>69</sup>

Ekstrak *H. sabdariffa* tidak menyebabkan perubahan pada marker fungsional renal seperti BUN dan CRE yang menandai bahwa pemberian ekstrak *H. sabdariffa* tidak memberikan efek pada fungsi renal. Suplemen ekstrak *H. sabdariffa* juga tidak merubah kadar glukosa darah, kadar ion, atau badan keton dalam plasma, ekstrak *H. sabdariffa* juga tidak memengaruhi fungsi insulin.<sup>7</sup>

## 2.6 Potensi Hibiscuss Sabdariffa Linn. untuk penanganan Obesitas

Anthocyanin seperti cyanidin-3-sambubioside dan delphindin-3-sambubioside diketahui sebagai komponen utama di ekstrak *H. sabdariffa*. *Cyanidin-3-O- $\beta$ -glukosida* menekan perkembangan obesitas akibat HFD pada tikus.<sup>74</sup>

*H. sabdariffa* juga menurunkan kadar kolesterol serum dan menghambat oksidasi LDL kelinci dan tikus, dan ekstrak *H. sabdariffa* kaya polyfenol memiliki efek kemopreventif yang bertindak lewat jalur pensinyalan *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). Pemberian ekstrak *H. sabdariffa* dalam bentuk kapsul menurunkan serum kolesterol pada manusia. Untuk mencegah obesitas, ekstrak *H. sabdariffa* dapat bekerja sebagai ajuvan. Perbaikan gejala kerusakan hepar dan status sindroma metabolik sejalan dengan pemberian ekstrak *H. sabdariffa* sebagai antiobesitas.<sup>7</sup>

Sindroma metabolik dan profil lipid pasien dapat diperbaiki oleh *H. sabdariffa*. Ekstrak *H. sabdariffa* mencegah hepatic steatosis melalui down regulasi dari PPAR $\gamma$  dan SREBP-1c, yang berperan pada obesitas yang diinduksi proses inflamasi, khususnya pada jaringan adiposa, hepar dan sistem vaskular. Kaliks dari *H. sabdariffa* kaya polyfenol, termasuk anthocyanin, flavonoids dan phenolic acids. *H. sabdariffa* polyphenol mencegah hiperglikemia dan hiperlipidemia, cegah lipogenesis hepatic. Beberapa, seperti derivat gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, quercetin, dan tiliroside terbukti efektif dalam menurunkan obesitas dan

gangguan terkait (Tabel 3). Serta ditemukan kadar asam aspartic yang sangat tinggi dibandingkan kadar lainnya (Tabel 4).<sup>22</sup>

Tatalaksana ekstrak *H. sabdariffa* memperbaiki *high fat diet induced obesity* dan akumulasi lipid pada kerusakan hepar yang ditunjukkan model hewan coba, serta aman.<sup>75</sup>

**Tabel 3. Efek ekstrak *H. Sabdariffa* dalam obesitas.**

Ingredient	Effect
Galloyl ester	Decrease body weight Decrease hepatic lipid
Chlorogenic acid	Decrease body weight Regulate obesity-related hormone Regulate lipid metabolism Attenuate fatty liver
Caffeic acid	Decrease body weight Regulate obesity-related hormone Regulate lipid metabolism Inhibit hepatic lipogenesis Promote hepatic lipolysis
Quercetin	Attenuate fatty liver Inhibit adipocyte differentiation Induce adipocyte apoptosis
Tiliroside	Regulate obesity-related hormone Promote hepatic lipolysis
Anthocyanines	Decrease body weight Decrease body fat Improve serum and liver lipid profiles Ameliorate impaired hepatic function

**Tabel 4. Komposisi asam amino dari ekstrak *H. Sabdariffa*.**

Amino acid	Content (mg/100 g)
Aspartic acid	1811.90
Threonine	nd <sup>a</sup>
Serine	106.41
Glutamic acid	227.31
Glycine	123.61
Alanine	109.74
Cysteine	48.30
Valine	49.21
Methionine	13.35
Isoleucine	42.19
Leucine	75.34
Tyrosine	27.94
Phenylalanine	73.68
Lysine	137.05
Histidine	58.41
Arginine	68.81
Proline	53.14
Total	3026.11

<sup>a</sup> nd: not detected.

Penelitian Huang 2015 menunjukkan pemberian ekstrak *H. sabdariffa* memberikan efisiensi yang sangat baik dalam meregulasi berat badan total dan kandungan lemak. Hampir setara dengan pemberian anthocyanin grup. Jumlah lemak yang turun pada hepar sangat berkaitan dengan dosis pemberian ekstrak *H.*

*sabdariffa*, semakin besar semakin baik, pada percobaan diberikan dosis 25, 50, 100 mg ekstrak *H. sabdariffa*, dibandingkan dengan pemberian anthocyanin saja dengan dosis 25 mg.<sup>76</sup>

Mekanisme potensial dari *H. sabdariffa* termasuk antihiperlipidemik, penurunan kolesterol plasma, penghambatan *gastric and pancreatic lipase*, stimulasi termogenesis, inhibisi akumulasi droplet lipid dalam sel lemak tanpa memengaruhi konversi adiposa, inhibisi fatty acid synthase. Serta menunjukkan target spesifik dari *H. sabdariffa* dalam proses differensiasi dari sel 3T3-L1 dapat berupa PPAR $\gamma$  dan C/EBP- $\alpha$  yang dapat menghambat akumulasi lemak.<sup>67</sup>

Selain itu PPAR $\gamma$  dan SREBP-1c merupakan regulator penting dalam metabolisme lipid hepar. Faktor transkripsi ini merangsang ekspresi beberapa enzim yang terlibat dalam sintesis asam lemak hati dan transport glukosa, glukoneogenesis dan lipolisis. Penurunan ekspresi gen SREBP-1c dan PPAR $\gamma$  pada mencit yang diberi HFD dan ekstrak *H. sabdariffa*, berkaitan dengan kejadian steatosis liver. Akumulasi masa lemak dan berat badan dihambat. Adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) menginaktivasi transkripsi SREBP-1c and PPAR $\gamma$  dan menghambat inhibits hepatic steatosis pada model hewan HFD-induced. Anthocyanin yang melimpah pada makanan mengaktifasi AMPK dan menurunkan ekspresi protein SREBP-1c, yang memberikan efek hipo lipidemik dan meredam steatosis hepar, serta HepG2 hepatosit. *H. sabdariffa* juga menghambat diferensiasi adiposit melalui jalur AMPK-PPAR- $\beta$  pathway, dan menghambat lipogenesis dan meningkatkan hepatic lipid clearance melalui AMPK-SREBP-1. AMPK juga memberikan potensi efek terapeutik dalam pencegahan dan tatalaksana diabetes tipe 2 dan obesitas, dengan mendukung obat metformin yang mengaktifasi AMPK.<sup>74</sup>

Efek pada metabolisme lipid

ekstrak *H. sabdariffa* memiliki efek menurunkan lipid, dalam studi invitro, ekstraknya (ekstrak air dan ethanol dari calyces atau daun kering) telah ditemukan untuk menurunkan kolesterol LDL, VLDL, kolesterol total, Trigliserida dan peroksidasi lipid, serta meningkatkan kadar HDL. Komposisi fungsional seperti



galloyl ester, asam chlorogenic, asam caffeic, quercetin, tiliroside dan anthocyanins dari ekstrak *H. sabdariffa* terlibat untuk ini. Senyawa ini memiliki peran penting dalam meregulasi metabolisme lipid dan juga menurunkan berat badan. Galloyl ester menurunkan hepatic lipid dan berat badan. Chlorogenic acid menurunkan serum kolesterol dan attenuate fatty liver dengan up-regulating ekspresi dari PPAR $\alpha$ . Chlorogenic acid dan caffeic acid meningkatkan dan memodulasi berat badan, metabolisme lipid dan kadar hormon yang berkaitan dengan obesitas. Caffeic acid menghambat lipogenesis hepar tapi mendorong lipolisis dan regulasi obesitas terkait hormon sehingga menurunkan berat badan. Quercetin menghambat differensiasi adiposit dan apoptosis adiposit. Tiliroside meregulasi obesitas terkait hormon dan mendorong lipolisis hepar dengan mengaktivasi sinyal adiponectin dan oksidasi lipid hepar. Anthocyanin menurunkan berat badan dan lemak tubuh dengan meningkatkan adiponektin dan menurunkan leptin dan adiposit. Dalam studi oleh Yang, ekstrak polifenol yang mengandung *protocatechuic acid*, *catechin*, *gallic acid*, *caffeic acid* dan *gallic acid* galates memperlihatkan kemampuan yang lebih baik dalam menurunkan kolesterol total, LDL-C dan meningkatkan kolesterol HDL-C dibandingkan ekstrak air dari ekstrak *H. sabdariffa* yang mengandung anthocyanin, polifenol acid dan flavonoid. Ini menurunkan kandungan lipid pada hepatosit melalui aktivasi AMPK dan menurunkan SREBP-1, sehingga menghambat ekspresi dari fatty acid synthase dan HMG-CoA reductase. Anthocyanin terutama delphinidin-3-sambubioside dan cyanidin-3-sambubioside, merupakan konstituen aktif yang bertanggung jawab untuk efek antihipertensi, antioksidan dan hipokolesterolemik dari ekstrak *H. sabdariffa*. Efek hypocholesterolemic ditemukan menurunkan serum kolesterol pada fructose-fed dan kolesterol-fed pada tikus dan kelinci. Ekstrak calyces dan daun dari *H. sabdariffa* menunjukkan efek antihiperlipidemia secara signifikan pada tikus hiperlipidemia yang diinduksi dengan cara meningkatkan kolesterol HDL dan menurunkan peroksidasi lipid. Pada manusia potensi telah diteliti dengan menggunakan ekstrak *H. sabdariffa* dalam bentuk kapsul dan dilaporkan menurunkan kolesterol subjek. Ekstrak *H. sabdariffa* juga mencegah oksidasi LDL dan kematian makrofag.<sup>5,77,78</sup>

### Efek pada adiposit

Differensiasi adiposit dan akumulasi lipid berkaitan dengan terjadinya dan perkembangan obesitas. Kandungan dari phytochemical menghambat differensiasi adiposit dengan memodulasi PI3-K/Akt dan ERK pathway yang memiliki peranan penting selama adipogenesis. Ekstrak *H. sabdariffa* menghambat ekspresi faktor transkripsi adipogenik, C/EBP $\alpha$  and PPAR $\gamma$ . Inhibisi differensiasi adiposit dan induksi apoptosis adiposit oleh quercetin terlihat pada studi invitro dimana 3T3-L1 sel adiposit yang di tatalaksana dengan ekstrak *H. sabdariffa* menghasilkan hambatan pada adipogenesis dan akumulasi dari *cytoplasmic lipid droplets*. Inhibisi dari adipogenesis dan penurunan massa sel adiposit dapat disebabkan juga efek lipolitik dari ekstrak *H. sabdariffa*.<sup>5,22,78</sup>

### Efek pada obesitas terkait enzim

Ekstrak *H. sabdariffa* menghambat obesitas terkait enzim seperti lipase pankreas, lipase lipoprotein,  $\alpha$ -glucosidase dan  $\alpha$ -amylase. Penelitian menunjukkan bahwa hibiscus acid dan cyanidin-3-glucoside yang ada pada rosella merupakan inhibitor aktif  $\alpha$ -amylase pankreas. ekstrak *H. sabdariffa* dari 2 varietas (merah dan putih) bagian calyces terkait dengan enzim yang menghidrolisis karbohidrat ( $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase), rosella merah menunjukkan aktivitas penghambatan  $\alpha$ -glucosidase lebih tinggi dari pada rosella putih, sedangkan rosella putih menunjukkan aktivitas penghambatan  $\alpha$ -amylase lebih tinggi dibandingkan rosella merah. Selain menghambat aktivitas  $\alpha$ -amylase, juga menghambat absorpsi gula dan tepung yang dapat membantu menurunkan berat badan. Penghambatan absorpsi glukosa oleh adanya  $\alpha$ -glucosidase inhibitor.<sup>5,78,79</sup>

**Tabel 5. Manfaat ekstrak *H. sabdariffa* pada obesitas**

Efek ekstrak <i>H. sabdariffa</i> pada obesitas	Mekanisme Kerja
<b>Metabolisme lipid</b>	Meningkatkan serum HDL Menurunkan kadar SGOT Menurunkan kadar SGPT Mencegah oksidasi LDL dan kematian makrofag menurunkan kolesterol LDL, VLDL, kolesterol total, Trigliserida dan peroksidasi lipid

<b>Adiposit</b>	mengatur PI3-K/Akt dan ERK pathway yang berperan pada adipogenesis menghambat ekspresi faktor transkripsi adipogenik, PPAR $\gamma$ dan C/EBP $\alpha$
<b>Enzim</b>	Menghambat lipase pankreas, lipase lipoprotein, $\alpha$ -glucosidase dan $\alpha$ -amylase

## BAB 3 METODE PENELITIAN

### 3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan bagian dari *roadmap* penelitian dari Departemen Fisiologi dengan tujuan meneliti fitofarmaka untuk penanganan obesitas. penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental *in vivo*. Jumlah hewan coba yang digunakan sebanyak 24 ekor tikus jantan yang dengan acak dibagi empat kelompok, yaitu (1) kelompok kontrol (KH0), (2) kelompok obes (OH0), (3) kelompok obes yang diberi *H. sabdariffa* 200mg/hari/kgBB (OH200), dan (4) kelompok obes yang diberi *H. sabdariffa* 400mg/hari/kgBB (OH400).

### 3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat dan waktu dilakukannya penelitian ini adalah di Laboratorium Rumah Hewan Biokimia FKUI dan Laboratorium Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia pada bulan April 2018 hingga Mei 2019.

### 3.3 Persetujuan Etik

Ini merupakan bagian studi penelitian dari payung penelitian yang telah disetujui Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dan telah terdaftar dengan nomor surat 0110/UN2.F1/ETIK/2018 dan nomor protokol 18-02-0119.

### 3.4 Subjek dan Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus jantan galur *Sprague Dawley*.<sup>80</sup> Berusia 6 hingga 10 minggu, berat badan antara 90 hingga 160 gram. Sebelum dan selama perlakuan, tikus diberi pakan dan minuman secara *ad libitum* serta kesehatan tikus juga dijaga agar tidak sakit, serta kebersihan kandang juga dijaga, serta pencahayaannya diatur 12 jam gelap dan 12 jam terang dengan suhu pada lingkungan sekitar diatur sebesar  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ . Tikus diinduksi diet tinggi lemak selama 17 minggu hingga tercipta kondisi obesitas.<sup>81,82</sup> Serta kondisi lainnya selama percobaan disesuaikan peraturan kode etik komisi penanganan dan penggunaan hewan coba.

Sampel diambil dari jaringan adiposa subkutan tikus.

### 3.5 Penetapan Jumlah Hewan Coba

Penentuan banyaknya jumlah sampel penelitian ditentukan dan dihitung menggunakan rumus Federer, yaitu:  $(t-1)(n-1) \geq 15$ , dengan variable t merupakan jumlah kelompok perlakuan, dan n merupakan jumlah tikus yang ada pada tiap kelompok.

$$(4-1)(n-1) \geq 15$$

$$3(n-1) \geq 15$$

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Berdasarkan hasil dari perhitungan rumus tersebut didapatkan jumlah sampel pada setiap kelompok minimal sebanyak enam ekor tikus, sehingga jika dihitung jumlah total sampel minimal menggunakan sebanyak 24 ekor tikus.

### 3.6 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

#### 3.6.1 Kriteria inklusi

Yang termasuk dalam kriteria inklusi adalah tikus galur *Sprague Dawley*, jenis kelamin jantan, berat badan 90-160 gram, usia 6 hingga 10 minggu, pada kelompok normal nilai indeks Lee harus dibawah 310, dan pada kelompok obes nilai indeks Lee harus diatas sama dengan 310 dan serta kondisi tikus juga sehat.

#### 3.6.2 Kriteria Eksklusi

Selama penelitian berlangsung tikus mengalami keadaan sakit dan mati.

### 3.7 Identifikasi Variabel

Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu pemberian ekstrak *H. sabdariffa*, variable terikat penelitian ini yaitu Indeks Lee, Ekspresi PGC1 $\alpha$  dan PPAR $\gamma$  di jaringan adiposa.

### 3.8 Alat dan Bahan

#### 3.8.1 Alat

Peralatan yang digunakan pada selama perlakuan adalah kandang tikus, timbangan digital, sonde lambung, penggaris, *syringe*, dan set peralatan bedah.

Peralatan yang dipakai selama sampel diperiksa adalah *microtube*, *tips*, *mikipipette*, sentrifuge, *spin down*, vortek, alu, mortar, dan set alat *real time* PCR.

### 3.8.2 Bahan Penelitian dan Reagensia

Beberapa bahan yang dipakai yaitu jaringan adiposa subkutan inguinal tikus, nitrogen cair, akuades, ekstrak metanol *H. sabdariffa* (diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat, Bogor), alkohol 70%, kit isolasi RNA Quick-RNA *MiniPrep Plus* (Zymo Research), kit sintesis cDNA ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA remover (Toyobo), kit running real time PCR SensiFAST SYBR® Hi-ROX (Bioline), dan juga primer gen PPAR $\gamma$  dan PGC1 $\alpha$  untuk *rattus norvegicus*, dan *housekeeping gene* GAPDH.

## 3.9 Cara Kerja

### 3.9.1 Pengelompokan Hewan Coba

Hewan coba dikelompokkan menjadi:<sup>81-86</sup>

- Kelompok kontrol normal diberikan pakan normal (KH0).
- Kelompok kontrol obes diberikan pakan diet tinggi lemak selama 17 minggu (OH0).
- kelompok tikus obes dengan pakan diet tinggi lemak yang diberi *H. sabdariffa* 200 mg/hari/kgBB (OH200).
- kelompok tikus obes dengan pakan diet tinggi lemak yang diberi *H. sabdariffa* 400 mg/hari/kgBB (OH400).

Sebelum diinduksi *high fat diet* selama 17 minggu, dilakukan penilaian obesitas menggunakan indeks Lee dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{indeks Lee} = \frac{\sqrt[3]{\text{berat badan (gram)}}}{\text{panjang badan (cm)}} \times 1000 \frac{\sqrt[3]{\text{berat badan}}}{\text{panjang badan}} \times d$$

kategori untuk tikus obes berdasarkan nilai hasil perhitungan indeks Lee tikus adalah lebih dari sama dengan 310 ( $\geq 310$ ), sedangkan untuk tikus normal nilainya harus kurang dari 310 ( $<310$ ).<sup>81,82</sup>

### 3.9.2 Pemberian Ekstrak Hibiscuss Sabdariffa Linn.

Ekstrak *H. sabdariffa* dibeli dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat Bogor dalam bentuk pasta. Kemudian ekstrak *H. sabdariffa* dilarutkan dengan air kemudian dihitung volumenya, dan selanjutnya ekstrak *H. sabdariffa* diberikan dengan cara sonde dengan dosis 200 mg dan 400 mg/kgBB/hari pada tikus obes. Ekstrak tersebut diberikan satu kali per hari selama 5 minggu.<sup>16,83</sup> Selama induksi ekstrak *H. sabdariffa*, kelompok tikus obes diberikan diet tinggi lemak (kadar Lemak 19,09%), sedangkan kelompok tikus normal diberikan diet standar (kadar Lemak 6,43%).

### 3.9.3 Pengukuran indeks Lee

Pengukuran indeks Lee dilakukan pada semua kelompok sampel penelitian tanpa terkecuali yaitu dilakukan pada waktu hari terakhir aklimatisasi sebelum masuk awal pemberian ekstrak *H. sabdariffa* dan juga dilakukan pada akhir pemberian ekstrak *H. sabdariffa*. Kategori untuk tikus obes berdasarkan nilai hasil perhitungan indeks Lee tikus adalah harus lebih dari sama dengan 310, sedangkan untuk tikus normal nilainya harus kurang dari 310.<sup>81,82</sup> Dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{indeks Lee} = \frac{\sqrt[3]{\text{berat badan (gram)}}}{\text{panjang badan (cm)}} \times 1000$$

Panjang badan yang dimaksud adalah panjang dari naso ke anal (naso-anal) tikus, bukan hingga ujung ekor tikus.

### 3.9.4 Prosedur Pengambilan Sampel

#### 3.9.4.1 Prosedur Dekapitasi dan Pengambilan Jaringan Lemak

Pada hari terakhir perlakuan, sampel darah tikus diambil dan selanjutnya tikus didekapitasi serta dilakukan pengambilan sampel jaringan. Sebelum di dekapitasi, tikus dianestesi dengan cara injeksi intraperitoneal memakai kombinasi *ketamin* 0,05 ml/kgBB dan *xylazine hydrochloride* 0,01 ml/kgBB. Sampel jaringan berupa jaringan adiposa yang diambil dari bagian subkutan hewan coba. Jaringan adiposa subkutan inguinal dieksisi, dan selanjutnya dibersihkan dengan NaCl 0,9%, ditimbang, dan kemudian disimpan dalam microtube. Sampel dimasukkan sementara ke nitrogen cair untuk selanjutnya dipindahkan ke dalam kulkas -80°C

hingga digunakan untuk pemeriksaan. Sampel jaringan adiposa digunakan untuk pemeriksaan ekspresi gen PPAR $\gamma$  dan PGC1 $\alpha$ .

### 3.9.5 Pemurnian RNA

Isolasi dan Pemurnian RNA memakai Quick-RNA™ MiniPrep Plus, R1058 dari ZYMO RESEARCH. Sampel digunakan adalah jaringan lemak subkutan yang sudah diambil dan disimpan pada suhu -80 °C. Berikut ini merupakan tahapan dalam proses pemurnian RNA:

#### 3.9.5.1 Persiapan sampel

Jaringan lemak (sampel) diambil dari kulkas -80 °C, selanjutnya dimasukkan ke dalam nitrogen cair, setelah itu sampel (sebanyak 30  $\mu$ g) di homogenisasi secara mekanik kemudian dicampurkan dengan DNA/RNA Shield sebanyak 600  $\mu$ l dalam tube dan di aduk rata. Selanjutnya tambahkan PK digestion buffer 60  $\mu$ l dan Proteinase K 30  $\mu$ l ke dalam larutan sampel jaringan tadi. Setelah larutan tercampur rata, larutan diinkubasi pada 55 °C dengan durasi 30 menit. Setelah diinkubasi, di vortex dan selanjutnya di sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 g selama 2 menit. Pindahkan supernatant (cairan) ke dalam RNase-free tube. Selanjutnya tambahkan RNA lysis Buffer sebanyak supernatant yang ada dan aduk rata.

#### 3.9.5.2 Pemurnian RNA / RNA Purification

Proses lanjutan yaitu pemurnian RNA yang diawali dengan pemindahan sampel yang sudah tercampur RNA lysis buffer ke dalam *Spin-Away Filter* warna kuning dalam *collection tube* dan disentrifugasi kecepatan 12.000 g selama 1 menit. Elusi yang terbentuk disimpan dan ditambah etanol dengan kadar 95-100% ke sampel dengan volume yang sama dan aduk rata. Campuran yang terbentuk dipindahkan ke dalam **Zymo-Spin™ IIICG** Column warna hijau dalam *collection tube* dan disentrifugasi 1 menit kecepatan 10.000 g. Elusi yang terbentuk dibuang, kemudian tambahkan RNA *Prep buffer* 400 uL kedalam kolom dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 g durasi 1 menit. Elusi yang terbentuk dibuang lagi. Selanjutnya cuci dengan RNA *wash buffer* 3 kali dan tambahkan 30 uL DNase/RNase *free water* ke matriks kolom lalu sentrifugasi 1 menit. Elusi yang jatuh di RNase *free tube* adalah sampel RNA yang digunakan pada proses



selanjutnya. Sampel RNA yang terbentuk disimpan dalam kulkas bersuhu  $\leq -70^{\circ}\text{C}$  atau dapat juga digunakan langsung.

### 3.9.6 Sintesis cDNA

Pembuatan cDNA dari RNA template memakai KIT TOYOBO yaitu ***Revertra Ace<sup>®</sup> qPCR RT Master Mix with gDNA Remover, FSQ-301***. Semua tindakan yang dilakukan menggunakan suhu tertentu, selain itu selama pembuatan cDNA dilakukan di atas es, selain perlakuan khusus yang diharuskan menggunakan suhu tertentu. Tahapan prosesnya adalah:

#### 3.9.6.1 Genomic DNA Removal (*DNase I treatment*)

Menggunakan gDNA remover yang merupakan *optimized DNase I solution* yang kemudian dicampur dengan *4x DN Master Mix* yang merupakan larutan yang mengandung *RNase inhibitor* dengan perbandingan 1:50. Persiapan larutan reagen DNase I dilakukan di atas es, yaitu mencampurkan *4x DN Master Mix* sebanyak 2  $\mu\text{l}$  ditambahkan RNA template sebanyak 0.5 pg - 0,5  $\mu\text{g}$  yang selanjutnya ditambahkan lagi Nuclease-Free Water secukupnya hingga maksimal volume sebanyak 8  $\mu\text{l}$ . Selanjutnya larutan reagen ini diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 5 menit.

#### 3.9.6.2 Reverse transcription (*cDNA synthesis*)

Pada proses ini menggunakan *5x RT Master Mix II* yang mengandung reverse transcriptase *Revertra Ace<sup>®</sup>*, *RNase inhibitor*, *oligo dT primer*, *random primer* dan *dNTPs*. Persiapan reagen untuk larutan *reverse transcription* dilakukan diatas es dengan cara *5x RT Master Mix II* sebanyak 2  $\mu\text{l}$  ditambahkan larutan yang sudah diinkubasi pada 3.9.6.1 yang sudah ada sebanyak 8  $\mu\text{l}$  sehingga total larutan menjadi 10  $\mu\text{l}$ . Selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit, dilanjutkan  $50^{\circ}\text{C}$  selama 5 menit dan kemudian ditingkatkan menjadi suhu  $98^{\circ}\text{C}$  selama 5 menit. Setelah selesai larutan cDNA yang sudah terbentuk dapat digunakan langsung untuk tahapan selanjutnya atau disimpan pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  atau  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.9.7 Metode Pemeriksaan Menggunakan Realtime PCR

Pengukuran ekspresi gen PPAR $\gamma$  dan PGC1 $\alpha$  menggunakan SensiFAST SYBR Hi-ROX Kit (Bioline) metode *two step*. Alat *Applied Biosystem RealTime PCR 7500* digunakan untuk menganalisa ekspresi gen. Desain primer PCR berdasarkan sekuens database NCBI (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), yang sesuai dengan ketentuan primer yang baik yaitu ukuran *PCR product size*, panjang primer, suhu atau  $T_m$ , *annealing temperature* optimal, *melting temperature* optimal, G/C konten, tidak ada *self-dimer*, dan primer harus berada antara *exon to exon* serta organisme yang sesuai yaitu *rattus norvegicus* (taxid:10116). Primer hasil NCBI di blast kembali memakai Primer3 untuk memastikan bahwa primer sudah baik.

- a. Primer yang dipakai untuk analisis ekspresi gen PPAR $\gamma$  (untuk pencarian PPAR $\gamma$  menggunakan PPAR $\gamma$ ) pada jaringan adiposa subkutan adalah :
  - *forward primer*: 5'-GACCTCTCTGTGATGGATGAC-3'
  - *reverse primer*: 5'-TCGCACTTTGGTATTCTTGGA-3'
  - *Gene accession number*: NM\_013124.3
- b. Primer yang dipakai untuk analisis ekspresi gen PGC-1 $\alpha$  (untuk pencarian PGC-1 $\alpha$  menggunakan *ppargc1a*) pada jaringan adiposa subkutan adalah :
  - *forward primer*: 5'-GTATGGAGTGACATAGAGTGTG-3'
  - *reverse primer*: 5'-GGCTCATTGTTGTAAGTGGTTG-3'
  - *Gene accession number*: NM\_031347.1
- c. *House Keeping gene* yang digunakan pada penelitian ini adalah glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh). Primer yang dipakai untuk analisis ekspresi Gapdh pada jaringan adiposa subkutan adalah :<sup>87</sup>
  - *forward primer*: 5'-TGCCACTCAGAAGACTGTGG-3'
  - *reverse primer*: 5'-TTCAGCTCTGGGATGACCTT-3'
  - *Gene accession number*: NM\_017008.4

Tahapan menganalisa gen PPAR $\gamma$  dan PGC1 $\alpha$  dengan menggunakan SensiFAST SYBR Hi-ROX Kit dimulai dari membuat PCR mastermix dengan volume akhir 20  $\mu$ l,

**Tabel 6. Pembuatan *Master mix***

Reagen	Volume	Konsentrasi akhir
2x SensiFAST SYBR No-Rox Mix	10 $\mu$ l	1x
10 $\mu$ M <i>primer forward</i>	0,8 $\mu$ l	400 nM
10 $\mu$ M <i>primer reverse</i>	0,8 $\mu$ l	400 nM
<i>Template</i> (sampel)	1 $\mu$ l	
H <sub>2</sub> O	7,4 $\mu$ l	
Volume Akhir	20 $\mu$ l	

Mix yang telah dibuat dimasukkan ke dalam well plate sebanyak 19  $\mu$ l dan kemudian dimasukkan template sampel sebanyak 1  $\mu$ l. Setelah itu, dilakukan siklus PCR 2 step cycling yang dimulai dengan aktivasi polimerase pada 95 °C durasi 2 menit sebanyak 1 siklus. Setelah itu dilakukan 40 siklus denaturasi pada 95 °C durasi 5 detik dan annealing/extension pada suhu 50 °C untuk PGC1 $\alpha$  selama 30 detik sedangkan untuk PPAR $\gamma$  dilakukan pada suhu 60 °C selama 30 detik.

Setelah reaksi selesai analisa data ekspresi gen dilakukan dengan menggunakan metode perhitungan Livak **Ekspresi relatif** =  $2^{-\Delta\Delta CT}$

Catatan:

$$\Delta CT (\text{uji}) = CT (\text{uji}) - CT (\text{referensi})$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{uji}) - \Delta CT (\text{kontrol})$$

Uji = PPAR $\gamma$  dan PGC-1 $\alpha$

Kontrol = Kelompok kontrol tanpa perlakuan (kelompok 1)

Referensi = GAPDH (*housekeeping gene*)

### 3.10 Definisi Operasional

Definisi operasional variable dalam penelitian ini diuraikan pada Tabel 7.

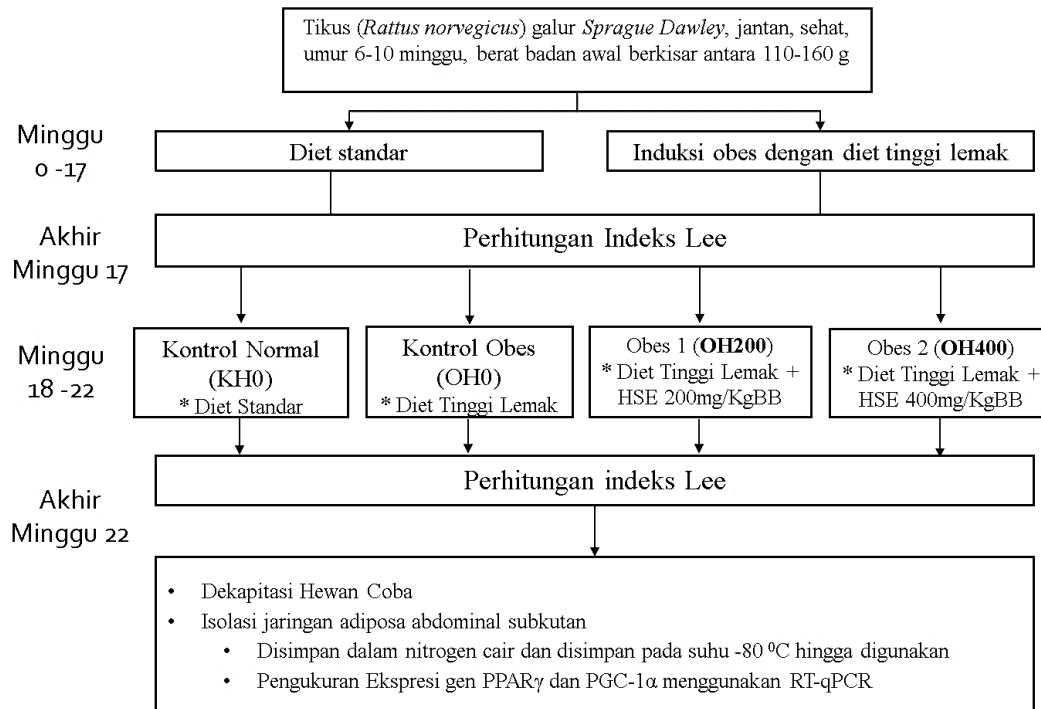
**Tabel 7. Definisi Operasional**

Variabel	Definisi Operasional	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
<b>Diet tinggi Lemak</b>	Jenis pakan dengan komposisi lemak 19%	Uji proksimat			
<b>Indeks Lee</b>	Berat badan pada tikus obes	$\frac{\sqrt[3]{\text{berat badan (gram)}}}{\text{panjang badan (cm)}} \times 1000$			Nominal
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>		Mengukur ekspresi mRNA	PCR		Nominal
<b>PGC-1<math>\alpha</math></b>		Mengukur ekspresi mRNA	PCR		Nominal

### 3.11 Analisis Data

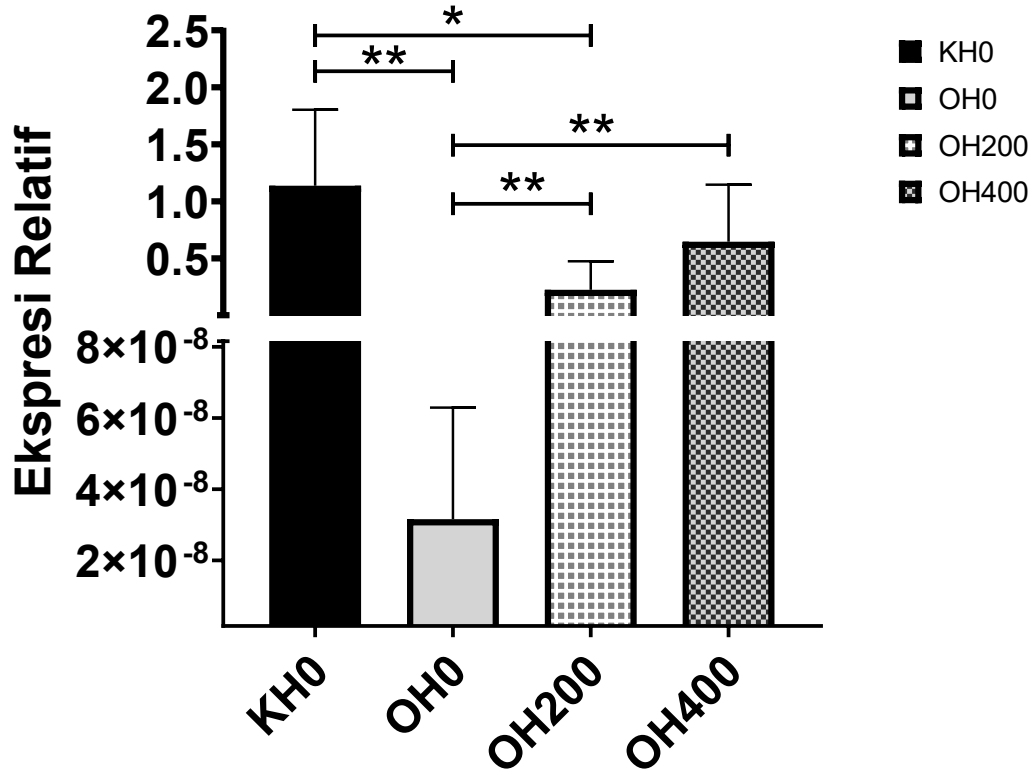
Semua Analisa data ini menggunakan *software* SPSS versi 20. Pada awal Analisa data, sebelum dilakukan uji parametrik dan nonparametrik, dilakukan uji normalitas menggunakan uji *Saphiro-Wilk* dan *Kolmogorov-Smirnov*. Uji homogenitas menggunakan uji *Levene's Test*. Analisa statistik hasil pengukuran Indeks Lee memakai uji parametrik ANOVA satu arah dan untuk hasil pemeriksaan PGC1 $\alpha$  dan PPAR $\gamma$  dianalisa memakai uji non parametrik Kruskal Wallis yang dilanjutkan dengan uji Mann Whitney. Nilai <0,05 dinilai signifikan secara statistik.

### 3.12 Alur Penelitian



## BAB 4 HASIL PENELITIAN

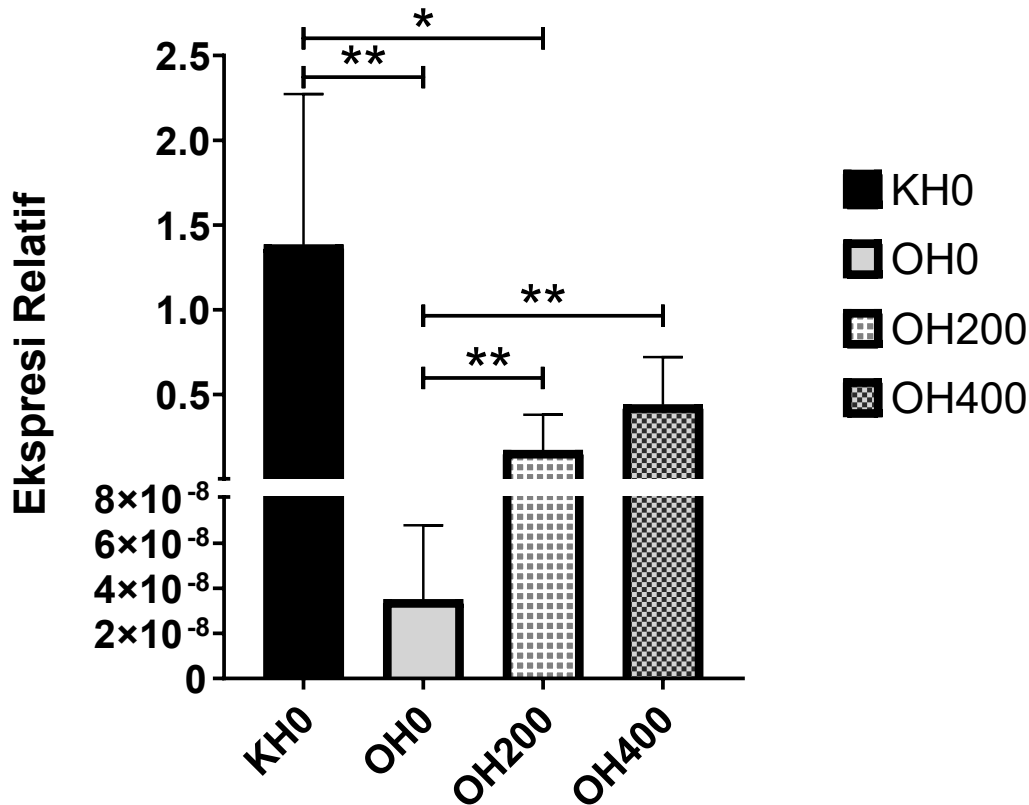
### 4.1 Pengaruh *H. sabdariffa* pada tikus obes terhadap ekspresi PPAR $\gamma$ di jaringan adiposa



Gambar 11. Ekspresi rata-rata PPAR $\gamma$ . Hasil analisa menggunakan uji non parametrik Kruskal Wallis menunjukkan perbedaan signifikan  $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*). KH0: Kelompok Kontrol Normal; OH0: Kelompok kontrol obes; OH200: Kelompok tikus obes yang diberikan *H. sabdariffa* dengan dosis 200 mg/KgBB/hari; OH400: Kelompok tikus obes yang diberikan *H. sabdariffa* dengan dosis 400 mg/KgBB/hari.

Seperti pada **Gambar 11**, Kelompok kontrol normal (KH0) memiliki ekspresi gen PPAR $\gamma$  lebih tinggi dibandingkan Kelompok kontrol tikus obes (OH0). Kelompok tikus yang diberikan ekstrak *H. sabdariffa* 200 mg/KgBB/hari dan 400 mg/KgBB/hari terbukti memiliki ekspresi gen PPAR $\gamma$  yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol obes (OH0). Kelompok kontrol normal (KH0) tidak memiliki perbedaan bermakna dengan kelompok yang diinduksi ekstrak *H. sabdariffa* 400 mg/KgBB/hari, yang artinya kelompok tikus yang diberikan ekstrak *H. sabdariffa* 400 mg/KgBB/hari mendekati seperti keadaan normal.

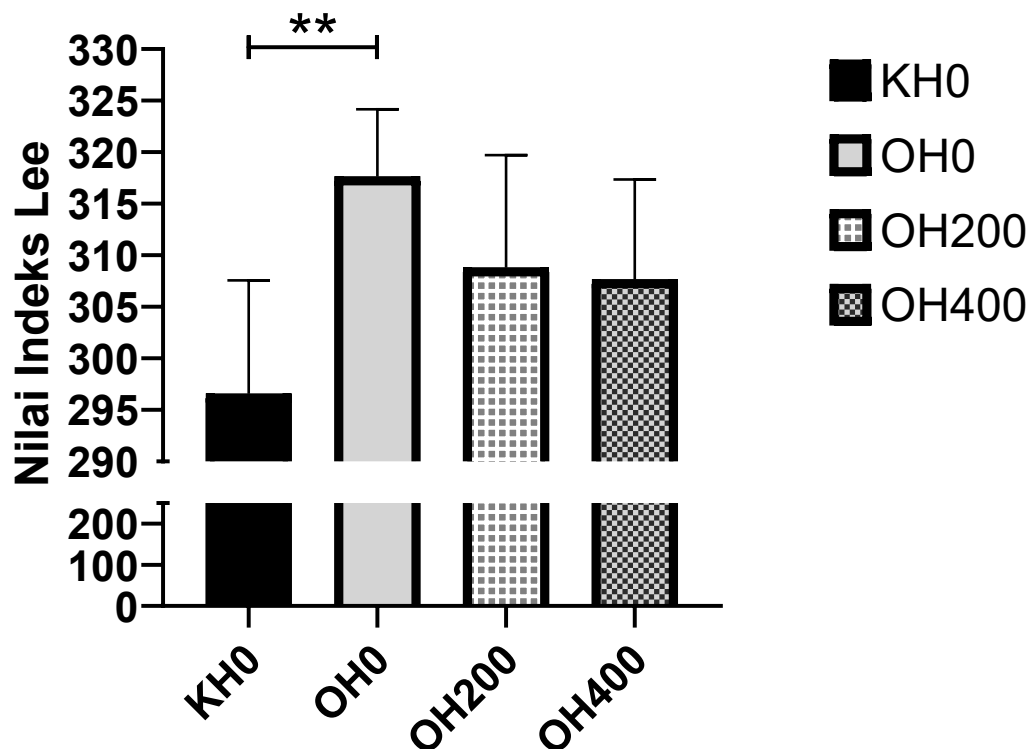
#### 4.2 Pengaruh *H. sabdariffa* pada tikus obes terhadap ekspresi PGC-1 $\alpha$ di jaringan adiposa



**Gambar 12.** Ekspresi rata-rata PGC1 $\alpha$ . Hasil analisa menggunakan uji non parametrik Kruskal Wallis menunjukkan perbedaan signifikan  $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*). KH0: Kelompok Kontrol Normal; OH0: Kelompok kontrol obes; OH200: Kelompok tikus obes yang diberikan *H. sabdariffa* dengan dosis 200 mg/KgBB/hari; OH400: Kelompok tikus obes yang diberikan *H. sabdariffa* dengan dosis 400 mg/KgBB/hari.

Seperti pada **Gambar 12**, kelompok kontrol normal (KH0) memiliki ekspresi gen PGC1 $\alpha$  lebih tinggi dibandingkan dengan Kelompok kontrol tikus obes (OH0). Kelompok tikus obese yang diberikan ekstrak *H. sabdariffa* 200 mg/KgBB/hari dan 400 mg/KgBB/hari terbukti memiliki ekspresi gen PGC1 $\alpha$  yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol obes (OH0) . Bahkan ekspresi gen PGC1 $\alpha$  pada kelompok obese yang di beri *H. sabdariffa* 400mg/KgBB/hari memiliki nilai seperti kelompok normal (KH0) ( $p > 0.05$ ). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian *H. sabdariffa* 400mg/KgBB/hari dapat meningkatkan ekspresi PGC1 $\alpha$  seperti keadaan normal.

### 4.3 Pengaruh *H. sabdariffa* pada tikus obes terhadap indeks Lee



Gambar 13. Nilai rata-rata Indeks Lee. Hasil analisa menggunakan ANOVA satu arah menunjukkan perbedaan signifikan  $p < 0,01$  (\*\*). KH0: Kelompok Kontrol Normal; OH0: Kelompok kontrol obes; OH200: Kelompok tikus obes yang diberikan *H. sabdariffa* dengan dosis 200 mg/KgBB/hari; OH400: Kelompok tikus obes yang diberikan *H. sabdariffa* dengan dengan dosis 400 mg/KgBB/hari.

Pada **Gambar 13** terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol normal (KH0) dan kelompok kontrol obes (OH0). Jika dianalisa statistik Parametrik ANOVA dan dilanjutkan dengan uji PostHoc Bonferroni ditemukan perbedaan bermakna antara Kelompok Kontrol (KH0) dengan Kelompok Obes (OH0) dengan nilai signifikansi  $p < 0.05$ . (\*\*) merupakan nilai signifikansi  $p < 0.01$ . Kelompok obes (OH0) jika dilihat dari nilai indeks Lee rata-rata dengan nilai  $\geq 310$ , yang artinya semua tikus dalam keadaan obes dibandingkan dengan kelompok kontrol (KH0) yang artinya pemberian diet tinggi lemak (lemak 19.09%) berhasil menyebabkan kelompok kontrol obes menjadi obes. Pada Kelompok yang diberikan ekstrak *H. sabdariffa* secara umum tampak lebih rendah dibandingkan dengan kelompok obes (OH0) dengan rata-rata  $< 310$  yang artinya normal.<sup>81,82</sup>





## BAB 5 PEMBAHASAN

### 5.1 Pengaruh *H. sabdariffa* pada tikus obes dilihat dari ekspresi PPAR $\gamma$ pada jaringan adiposa

PPAR $\gamma$  merupakan faktor transkripsi yang merupakan master regulator dari seluruh tipe adipogenesis sel lemak. PPAR $\gamma$  berperan dalam proses differensiasi sel preadiposit menjadi sel adiposit putih. PPAR $\gamma$  dan C/EBP $\alpha$  akan menghambat proses adipogenesis sel adiposa putih. Selain itu, PPAR $\gamma$  juga berperan dalam proses pencoklatan. PPAR $\gamma$  bekerja bersama dengan PRDM16 dan faktor transkripsi untuk menginduksi proses pencoklatan.<sup>62</sup>

Penelitian berikut ini menunjukkan penurunan PPAR $\gamma$  pada kelompok tikus obese. Penelitian yang dilakukan oleh motawi (2017) mendukung kondisi ini, yaitu kelompok obes dan kelompok *colorectal cancer* obes ekspresi PPAR $\gamma$  nya lebih rendah dibanding kontrol yang disebabkan oleh tingginya metilasi promotor PPAR $\gamma$ .<sup>88</sup> Penelitian Zuo (2017) ekspresi protei PPAR $\gamma$  pada kelompok tikus obes lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol.<sup>89</sup> Pada penelitian yang dilakukan oleh Liu (2018) juga ekspresi relatif mRNA PPAR $\gamma$  kelompok obes lebih rendah jika dibandingkan bersama kelompok kontrol.<sup>90</sup>

Namun pemberian *H. sabdariffa* dapat memengaruhi ekspresi PPAR $\gamma$ , hal ini dibuktikan pada penelitian Kim (2012), kandungan yang ada pada *black soybean* menyerupai kandungan yang ada pada *H. sabdariffa* yaitu cyanidine-3-O-glucoside (68.3%) dan delphinidin-3-glucoside (25.2%) memengaruhi ekspresi PPAR $\gamma$  yang berakibat terhambatnya diferensiasi adiposit.<sup>91</sup> Pada Khalilpourfarshbafi (2019) menunjukkan Flavonoid menghambat PPAR $\gamma$ .<sup>92</sup>

Hal ini disebabkan *H. sabdariffa* mengandung polifenol yang dapat meningkatkan aktivitas AMPK. Hal ini dibuktikan melalui penelitian zhao 2017 yang menemukan kombinasi pengobatan menggunakan quercetin dan resveratrol dapat menekan obesitas dan inflamasi terkait melalui jalur pensinyalan AMPK $\alpha$ 1/SIRT1 pada adiposit tikus yang diberikan diet tinggi lemak.<sup>93</sup> Penelitian

Lee 2017 pada “*onion peel*” yang memiliki kadar quercetin yang tinggi, terjadi proses pencoklatan melalui jalur AMPK – SIRT1.<sup>94</sup>

Dengan demikian, *H. sabdariffa* dapat berperan meningkatkan PPAR $\gamma$  yang berperan pada proses pencoklatan. PPAR $\gamma$  merupakan salah satu dari faktor transkripsi pada jalur proses pencoklatan bersama dengan faktor transkripsi PRDM16 meningkatkan ekspresi PGC1 $\alpha$  kemudian meningkatkan biogenesis mitokondria dan meningkatkan ekspresi UCP1 yang merupakan biomarker terjadinya proses pencoklatan.<sup>9,58,95</sup>

## **5.2 Pengaruh *H. sabdariffa* pada tikus obes dilihat dari ekspresi PGC-1 $\alpha$ pada jaringan adiposa**

Pada proses pencoklatan, ekspresi PGC1 $\alpha$  dipengaruhi oleh adanya peningkatan PPAR $\gamma$  dan juga dipengaruhi melalui jalur persarafan simpatik  $\beta$ 3 adrenergik. Perubahan suhu dingin akan mengaktivasi jalur persarafan simpatik  $\beta$ 3 adrenergik. Hal ini diperlukan sebagai mekanisme pertahanan tubuh optimum terhadap adanya perubahan suhu eksternal yang ekstrim agar suhu tubuh tetap pada kondisi optimum. Untuk menjaga suhu tubuh tetap normal dalam menghadapi lingkungan luar yang dingin, tubuh memproduksi panas dengan cara proses thermogenesis, yang diketahui ada metode *shivering thermogenesis* dan juga metode *non shivering thermogenesis*.

Adapun persinyalan saraf simpatis norepinephrine yang berikatan dengan reseptor  $\beta$  adrenergik bekerja sama dengan G-protein akan meningkatkan konsentrasi Cyclic Adenosine monophosphate (cAMP). Kemudian aktivitas CAMP-dependent protein kinase (PKA) akan mengalami fosforilasi sehingga mengaktifkan hormone sensitive lipase yang berperan pada lipolisis. Cyclic Adenosine monophosphate (cAMP juga mengalami fosforilasi dengan cAMP responsive element binding protein (CREB) yang akan meningkatkan ekspresi gen PGC1 $\alpha$ . Selain itu terdapat jalur lain CAMP-dependent protein kinase (PKA) mengaktifkan AMPK yang meningkatkan Sirt1 yang selanjutnya meningkatkan ekspresi PGC1 $\alpha$ .<sup>37,96</sup>

Pemberian ekstrak *H. sabdariffa* menunjukkan peningkatan ekspresi gen PGC1 $\alpha$  yang sangat memengaruhi proses pencoklatan. Pemberian ekstrak *H. sabdariffa* menunjukkan efek yang sangat positif dalam melawan keadaan obesitas melalui jalur pencoklatan yaitu mendekati kelompok kontrol normal jika dibandingkan dengan kelompok kontrol obes. Hasil akhir dari pemberian ekstrak *H. sabdariffa* yang meningkatkan ekspresi PGC1 $\alpha$ , diharapkan dapat mengatasi keadaan obesitas. Tentunya keadaan ini juga harus dilihat dari naik turunnya berat badan pada tikus.

Pada jurnal Zhang (2015), menunjukkan C/EBP $\beta$  mengaktifkan ekspresi PPAR $\gamma$  dan PGC1 $\alpha$ , dimana kemudian merekrut kompleks transkripsi PRDM16 dan EBF2 menginduksi UCP1. AMPK secara langsung memfosforilasi PGC1 $\alpha$ , dan mencetuskan sinyal agar terjadi deasetilasi PGC1 $\alpha$  oleh SIRT1.<sup>97</sup> Jurnal Jeon (2016) menunjukkan kadar glukosa tinggi menghambat SIRT1 yang akhirnya meningkatkan kadar AMPK, dimana fungsi AMPK menghambat sintesis asam lemak, kolesterol dan trigliserida, dan meningkatkan uptake Asam lemak dan  $\beta$ -oksidan. AMPK menghambat sintesis asam lemak dengan cara menghambat fosforilasi acetyl-coA carboxylase 1 (ACC1), yang mengkatalisasi pembatasan dalam sintesis asam lemak dengan mengubah *acetyl-coA* menjadi *malonyl-coA*, dan *sterol regulatory element-binding protein 1c* (SREBP1c), faktor transkripsi yang meningkatkan ekspresi enzim lipogenic termasuk sintase asam lemak dan ACC1. Jumlah sintesis asam lemak yang tinggi disimpan sebagai trigliserida. Terdapat beberapa mekanisme aktivasi PGC1 $\alpha$  yang diinduksi oleh AMPK yaitu: fosforilasi langsung dari PGC1 $\alpha$ , aktivasi PGC1 $\alpha$  yang dimediasi proses asetilasi SIRT1 melalui peningkatan NAD<sup>+</sup>/NADH *ratio*. SIRT1 mengaktifkan AMPK dengan deasetilasi LKB1, yang menunjukkan adanya umpan balik positif antara AMPK dan SIRT1.<sup>98</sup> Penelitian tim peneliti Kartinah (2019) menunjukkan *H. sabdariffa* meningkatkan FGF21 jaringan adiposa dan hati, dimana FGF21 berikatan dengan reseptornya FGFR1 dan  $\beta$ -kloto kemudian meningkatkan SIRT1 yang selanjutnya meningkatkan ekspresi PGC1 $\alpha$ .<sup>85</sup>

Penelitian Lee (2017) menyimpulkan quercetin meningkatkan ekspresi PGC1 $\alpha$  menyebabkan efek browning melalui jalur AMPK/SIRT1/PGC1 $\alpha$ .<sup>94</sup> Studi

Otieno (2019) pemberian quercetin selama 16 minggu juga menunjukkan peningkatan PGC1 $\alpha$ , PRDM16, UCP1, dan juga fosforilasi AMPK.<sup>24</sup> Meningkatnya ekspresi PGC1 $\alpha$  pada proses pencoklatan memengaruhi tahapan selanjutnya yaitu meningkatnya biogenesis mitokondria. Dengan meningkatnya biogenesis mitokondria, ekspresi UCP1 yang selanjutnya menjadi transporter mitokondria UCP1 yang terdapat pada membran dalam mitokondria jumlahnya ikut meningkat sehingga, terjadi proses *thermogenesis* adaptif berupa *nonshivering thermogenesis* yang diinisiasi oleh adanya “*protein leakage*”. Tentunya proses ini juga sangat memengaruhi pemakaian energi berupa panas yang dapat membantu dalam mengatasi keadaan obesitas.

### 5.3 Pengaruh *H. sabdariffa* pada tikus obes dilihat dari indeks Lee

Ketidakseimbangan antara asupan energi dengan penggunaan energi menyebabkan obesitas.<sup>5,6</sup> Diet tinggi lemak dapat menyebabkan terjadinya obesitas yang salah satunya dikarenakan tingginya asupan makanan berupa makanan tinggi kalori. Pada tikus Kontrol (KH0) dilakukan pemberian pakan standar dengan kadar 6% Lemak, pada Kelompok Obes (OH0) dan Obes dengan perlakuan berupa pemberian ekstrak *H. sabdariffa* dengan dosis 200mg/kgBB (OH200) dan dosis 400 mg/kgBB (OH400) diberikan pemberian pakan khusus berupa pakan dengan diet tinggi lemak yaitu 19.09% lemak mengikuti penelitian yang sebelumnya sudah dilakukan oleh tim peneliti NT Kartinah dapat membuat tikus penelitian menjadi obes.<sup>99,100</sup> Pada penelitian ini terdapat perbedaan bermakna ( $p < 0,05$ ) antara KH0 dengan OH0, yang merupakan hasil yang bagus, artinya pakan khusus dapat menyebabkan tikus mengalami peningkatan bermakna dilihat dari Indeks Lee yang rata-rata nilai Indeks Lee lebih dari 310 yang artinya rata-rata kelompok tikus OH0 adalah tikus obes, dan memang berbeda bermakna secara statistik, selain itu juga tidak ditemukan perbedaan bermakna antara kelompok KH0 dibandingkan dengan Kelompok OH200 dan OH400 merupakan hasil yang bagus juga, yang artinya pemberian ekstrak *H. sabdariffa* pada kelompok tersebut tidak membuat tikus yang mendapatkan diet tinggi lemak mengalami peningkatan bermakna dilihat dari nilai Indeks Lee.

Tujuan dari seluruh proses pencoklatan adalah penurunan angka kejadian obesitas, pada kasus ini, indikator obes dari hewan penelitian tikus dilihat dari Indeks Lee.<sup>81,82</sup> Sepanjang proses dari awal terjadinya proses pencoklatan hingga terciptanya *beige* adiposit dan terjadi nya thermogenesis, sungguh merupakan proses yang kompleks. Hal ini pada akhirnya dinilai dengan penurunan berat badan atau nilai indikator obes. Pada pemberian ekstrak *H. sabdariffa* terbukti menunjukkan rata-rata nilai Indeks Lee dibawah 310 dibandingkan kelompok kontrol obes. Yang artinya pemberian ekstrak *H. sabdariffa* memengaruhi proses pencoklatan dan dilihat dari hasilnya tikus rata-rata tidak mengalami obesitas walaupun diberikan diet tinggi lemak. Sesuai dengan manfaat dan tujuan penelitian, ekstrak *H. sabdariffa* menunjukkan pengaruhnya dalam mengatasi keadaan obesitas melalui jalur pencoklatan / *beiging process*.

Peningkatan Data Shin (2018) menunjukkan *olive oil* menurunkan akumulasi lemak dan ini dikaitkan dengan jalur peningkatan thermogenesis.<sup>101</sup> Dengan tingginya thermogenesis, terjadi penurunan akumulasi lemak yang disimpan menjadi energi panas. Sehingga akumulasi lemak menjadi rendah dan jika diukur dengan Indeks Lee (tikus) nilai menjadi turun atau pada manusia (indeks masa tubuh) menjadi turun. Dengan ini diharapkan prevalensi obesitas menjadi turun. Lypolisis disebabkan oleh peningkatan mitokondria yang kerjanya menghasilkan energi, salah satunya adalah energi panas yang dihasilkan melalui UCP1 lewat mekanisme kebocoran proton.<sup>15,102</sup> Meningkatnya UCP1 disebabkan oleh peningkatan ekspresi PPAR $\gamma$  dan PGC1 $\alpha$ . Pemberian ekstrak *H. sabdariffa* diduga dapat meningkatkan thermogenesis melalui jalur PPAR $\gamma$ . Selain itu meningkatnya PGC1 $\alpha$  dapat meningkatkan biogenesis mitokondria dan meningkatkan ekspresi UCP1 yang berperan dalam thermogenesis.<sup>103</sup> Penelitian payung yang sama dilakukan oleh Afifa (2019) meneliti mengenai Efek PRDM16 dan UCP1 menunjukkan hasil yang sesuai yaitu ekstrak *H. sabdariffa* meningkatkan PRDM16 dan UCP1 yang merupakan biomarker dari proses pencoklatan.<sup>104</sup>

## BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1 Kesimpulan

Ekstrak *H. sabdariffa* meningkatkan ekspresi faktor transkripsi proses pencoklatan PPAR $\gamma$  dan PGC1 $\alpha$  sehingga memberikan hasil penurunan Indeks Lee yang merupakan salah satu indikator obesitas pada tikus.

### 6.2 Saran

- Pemeriksaan lanjutan *H. sabdariffa* pada jalur AMPK
- Pemeriksaan lanjutan *H. sabdariffa* pada jalur Sirt1 dan PRDM16
- Pemeriksaan lanjutan *H. sabdariffa* pada  $\beta$  adrenergik terkait dengan PGC1 $\alpha$ .
- Penelitian lainnya untuk mengetahui efek toksisitas dari ekstrak *H. sabdariffa* pada berbagai organ lainnya.
- Pemeriksaan lanjutan *H. sabdariffa* menggunakan jaringan histologi menggunakan pewarnaan hematoxylin dan eosin.

## DAFTAR PUSTAKA

1. repository GHOD. Prevalence of obesity among adults, BMI  $\geq$  30, age-standardized Estimates by WHO region: WHO; 2017 [Available from: <http://apps.who.int/gho/data/view.main.REGION2480A?lang=en>].
2. Obesity and overweight: World Health Organization; 2018 [cited 2019 August]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
3. Liu X, Cervantes C, Liu F. Common and distinct regulation of human and mouse brown and beige adipose tissues: a promising therapeutic target for obesity. *Protein Cell*. 2017;8(6):446-54.
4. Kemenkes RI. Hasil Utama Riskesdas 2018. 2018:1-200.
5. Sheba L A, A I. Anti-obesity effect of hibiscus Sabdariffa.- a review. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2016;7(4):341-5.
6. Karbiener M, Scheideler M. MicroRNA Functions in Brite/Brown Fat - Novel Perspectives towards Anti-Obesity Strategies. *Comput Struct Biotechnol J*. 2014;11(19):101-5.
7. Kao ES, Yang MY, Hung CH, Huang CN, Wang CJ. Polyphenolic extract from Hibiscus sabdariffa reduces body fat by inhibiting hepatic lipogenesis and preadipocyte adipogenesis. *Food Funct*. 2016;7(1):171-82.
8. Giralt M, Villarroya F. White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? *Endocrinology*. 2013;154(9):2992-3000.
9. Chen LH, Chien YW, Liang CT, Chan CH, Fan MH, Huang HY. Green tea extract induces genes related to browning of white adipose tissue and limits weight-gain in high energy diet-fed rat. *Food Nutr Res*. 2017;61(1):1347480.
10. Tang X, Li J, Zhao WG, Sun H, Guo Z, Jing L, et al. Comprehensive map and functional annotation of the mouse white adipose tissue proteome. *PeerJ*. 2019;7:e7352.
11. Bargut TCL, Souza-Mello V, Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA. Browning of white adipose tissue: lessons from experimental models. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2017;31(1).
12. Feng S, Reuss L, Wang Y. Potential of Natural Products in the Inhibition of Adipogenesis through Regulation of PPAR $\gamma$  Expression and/or Its Transcriptional Activity. *Molecules*. 2016;21(10).
13. Xu S, Chen P, Sun L. Regulatory networks of non-coding RNAs in brown/beige adipogenesis. *Biosci Rep*. 2015;35(5):e00262-e.
14. Thyagarajan B, Foster MT. Beiging of white adipose tissue as a therapeutic strategy for weight loss in humans. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2017;31(2).
15. Crichton PG, Lee Y, Kunji ER. The molecular features of uncoupling protein 1 support a conventional mitochondrial carrier-like mechanism. *Biochimie*. 2017;134:35-50.
16. Ilyas EII, Kartinah NT, Andraini T, Goenarjo RA, Kahandjak DN. Effects of Hibiscus sabdariffa Linn. on insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3) to prevent overtraining syndrome. *Medical Journal of Indonesia*. 2015;23(4):187-91.
17. I. Ilyas I, T. Kartinah N, Andriani T, A. Goenarjo R, N. Kahandjak D, J Freisleben H. Effects of Hibiscus sabdariffa Linn. on Malondialdehyde and Glutathione Peroxidase in an Overtraining Rat Model characterized by Growth Hormone, Insulin-like Growth Factor-1, and Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3. *Biomedical and Pharmacology Journal*. 2017;10(1):19-27.
18. Lakshmi R, et al. The potency of hibiscus sabdariffa linn. on decreased memory function related to the level of bdnf and creb in hippocampus of overtrained rats. *International Journal of Recent Scientific Research*. 2017;8(8):1005-19008.
19. Herranz-Lopez M, Olivares-Vicente M, Encinar JA, Barrajon-Catalan E, Segura-Carretero A, Joven J, et al. Multi-Targeted Molecular Effects of Hibiscus sabdariffa Polyphenols: An Opportunity for a Global Approach to Obesity. *Nutrients*. 2017;9(8).
20. Mahadevan N, Kamboj S, Kamboj P. Hibiscus sabdariffa Linn . – An overview. *Natural Product Radiance*. 2009;8(1):77-83.
21. Chung S, Kim YJ, Yang SJ, Lee Y, Lee M. Nutrigenomic Functions of PPARs in Obesogenic Environments. *PPAR Res*. 2016;2016(1):4794576.



22. Chang HC, Peng CH, Yeh DM, Kao ES, Wang CJ. Hibiscus sabdariffa extract inhibits obesity and fat accumulation, and improves liver steatosis in humans. *Food Funct.* 2014;5(4):734-9.
23. Carvajal-Zarrabal O, Barradas-Dermitz DM, Orta-Flores Z, Hayward-Jones PM, Nolasco-Hipolito C, Aguilar-Uscanga MG, et al. Hibiscus sabdariffa L., roselle calyx, from ethnobotany to pharmacology. *J Exp Pharmacol.* 2012;4:25-39.
24. Otieno D, Pei Y, Gu I, Lee S-O, Kang HW. Effect of Quercetin on Non-shivering Thermogenesis and Intestinal Microbial Populations (P06-037-19). *Current Developments in Nutrition.* 2019;3(Supplement\_1).
25. Consultation WHOE. Appropriate body-mass index for Asian populations and its implications for policy and intervention strategies. *Lancet.* 2004;363(9403):157-63.
26. BMI classification: World Health Organization; [updated 29 August 2019. Available from: [http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro\\_3.html](http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html).
27. Carey AL, Vorlander C, Reddy-Luthmoodoo M, Natoli AK, Formosa MF, Bertovic DA, et al. Reduced UCP-1 content in in vitro differentiated beige/brite adipocytes derived from preadipocytes of human subcutaneous white adipose tissues in obesity. *PLoS One.* 2014;9(3):e91997.
28. Obregon MJ. Adipose tissues and thyroid hormones. *Front Physiol.* 2014;5(December):479.
29. Cedikova M, Kripnerova M, Dvorakova J, Pitule P, Grundmanova M, Babuska V, et al. Mitochondria in White, Brown, and Beige Adipocytes. *Stem Cells Int.* 2016;2016:6067349.
30. Keipert S, Jastroch M. Brite/beige fat and UCP1 - is it thermogenesis? *Biochim Biophys Acta.* 2014;1837(7):1075-82.
31. Liu P, Ji Y, Yuen T, Rendina-Ruedy E, DeMambro VE, Dhawan S, et al. Blocking FSH induces thermogenic adipose tissue and reduces body fat. *Nature.* 2017;546(7656):107-12.
32. Peng XR, Gennemark P, O'Mahony G, Bartesaghi S. Unlock the Thermogenic Potential of Adipose Tissue: Pharmacological Modulation and Implications for Treatment of Diabetes and Obesity. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2015;6(NOV):174.
33. Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med.* 2013;19(10):1252-63.
34. Chi J, Cohen P. The Multifaceted Roles of PRDM16: Adipose Biology and Beyond. *Trends Endocrinol Metab.* 2016;27(1):11-23.
35. Stine RR, Shapira SN, Lim HW, Ishibashi J, Harms M, Won KJ, et al. EBF2 promotes the recruitment of beige adipocytes in white adipose tissue. *Mol Metab.* 2016;5(1):57-65.
36. Hu J, Christian M. Hormonal factors in the control of the browning of white adipose tissue. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2017;31(1):1-13.
37. Song W, Luo Q, Zhang Y, Zhou L, Liu Y, Ma Z, et al. Organic cation transporter 3 (Oct3) is a distinct catecholamines clearance route in adipocytes mediating the beiging of white adipose tissue. *PLoS Biol.* 2019;17(1):e2006571.
38. Trajkovski M, Lodish H. MicroRNA networks regulate development of brown adipocytes. *Trends Endocrinol Metab.* 2013;24(9):442-50.
39. Alvarez-Crespo M, Csikasz RI, Martinez-Sanchez N, Dieguez C, Cannon B, Nedergaard J, et al. Essential role of UCP1 modulating the central effects of thyroid hormones on energy balance. *Mol Metab.* 2016;5(4):271-82.
40. Li G, Xie C, Lu S, Nichols RG, Tian Y, Li L, et al. Intermittent Fasting Promotes White Adipose Browning and Decreases Obesity by Shaping the Gut Microbiota. *Cell Metab.* 2017;26(4):672-85 e4.
41. Worthmann A, John C, Rühlemann MC, Baguhl M, Heinsen F-A, Schaltenberg N, et al. Cold-induced conversion of cholesterol to bile acids in mice shapes the gut microbiome and promotes adaptive thermogenesis. *Nature Medicine.* 2017;23:839.
42. Lee HH, An SM, Ye BJ, Lee JH, Yoo EJ, Jeong GW, et al. TonEBP/NFAT5 promotes obesity and insulin resistance by epigenetic suppression of white adipose tissue beiging. *Nat Commun.* 2019;10(1):3536.
43. Berry DC, Jiang Y, Arpke RW, Close EL, Uchida A, Reading D, et al. Cellular Aging Contributes to Failure of Cold-Induced Beige Adipocyte Formation in Old Mice and Humans. *Cell Metab.* 2017;25(1):166-81.

44. Azhar S. Peroxisome proliferator-activated receptors, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Future Cardiology*. 2011;6(5):657-91.
45. Corrales P, Vidal-Puig A, Medina-Gomez G. PPARs and Metabolic Disorders Associated with Challenged Adipose Tissue Plasticity. *Int J Mol Sci*. 2018;19(7):2124-.
46. Tyagi S, Gupta P, Saini AS, Kaushal C, Sharma S. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *J Adv Pharm Technol Res*. 2011;2(4):236-40.
47. Mueller E. Understanding the variegation of fat: novel regulators of adipocyte differentiation and fat tissue biology. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842(3):352-7.
48. Brunmeir R, Xu F. Functional Regulation of PPARs through Post-Translational Modifications. *Int J Mol Sci*. 2018;19(6).
49. Varga T, Czimmerer Z, Nagy L. PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1812(8):1007-22.
50. Sauer S. Ligands for the Nuclear Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma. *Trends Pharmacol Sci*. 2015;36(10):688-704.
51. Choi SS, Park J, Choi JH. Revisiting PPARgamma as a target for the treatment of metabolic disorders. *BMB Rep*. 2014;47(11):599-608.
52. Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C, Atkins AR, Downes M, et al. PPARgamma signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med*. 2013;19(5):557-66.
53. Paracchini V, Pedotti P, Taioli E. Genetics of leptin and obesity: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2005;162(2):101-14.
54. Lo KA, Sun L. Turning WAT into BAT: a review on regulators controlling the browning of white adipocytes. *Biosci Rep*. 2013;33(5):711-9.
55. Bechmann LP, Hannivoort RA, Gerken G, Hotamisligil GS, Trauner M, Canbay A. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *J Hepatol*. 2012;56(4):952-64.
56. Inagaki T, Sakai J, Kajimura S. Transcriptional and epigenetic control of brown and beige adipose cell fate and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2016;17(8):480-95.
57. Jahansouz C, Xu H, Hertzel AV, Kizy S, Steen KA, Foncea R, et al. Partitioning of adipose lipid metabolism by altered expression and function of PPAR isoforms after bariatric surgery. *Int J Obes (Lond)*. 2018;42(2):139-46.
58. van den Berg SM, van Dam AD, Rensen PC, de Winther MP, Lutgens E. Immune Modulation of Brown(ing) Adipose Tissue in Obesity. *Endocr Rev*. 2017;38(1):46-68.
59. Quelle FW, Sigmund CD. PPARgamma: no SirT, no service. *Circ Res*. 2013;112(3):411-4.
60. Lasar D, Rosenwald M, Kiehlmann E, Balaz M, Tall B, Opitz L, et al. Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma Controls Mature Brown Adipocyte Inducibility through Glycerol Kinase. *Cell Rep*. 2018;22(3):760-73.
61. Defour M, Dijk W, Ruppert P, Nascimento EBM, Schrauwen P, Kersten S. The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\alpha$  is dispensable for cold-induced adipose tissue browning in mice. 2018. p. 39-54.
62. Ishibashi J, Seale P. Functions of Prdm16 in thermogenic fat cells. *Temperature (Austin)*. 2015;2(1):65-72.
63. Fenzl A, Kiefer FW. Brown adipose tissue and thermogenesis. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2014;19(1):25-37.
64. Mottillo EP, Desjardins EM, Crane JD, Smith BK, Green AE, Ducommun S, et al. Lack of Adipocyte AMPK Exacerbates Insulin Resistance and Hepatic Steatosis through Brown and Beige Adipose Tissue Function. *Cell Metab*. 2016;24(1):118-29.
65. Herranz-Lopez M, Olivares-Vicente M, Boix-Castejon M, Caturla N, Roche E, Micol V. Differential effects of a combination of Hibiscus sabdariffa and Lippia citriodora polyphenols in overweight/obese subjects: A randomized controlled trial. *Sci Rep*. 2019;9(1):2999.
66. Ademiluyi AO, Oboh G. Aqueous extracts of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) varieties inhibit alpha-amylase and alpha-glucosidase activities in vitro. *J Med Food*. 2013;16(1):88-93.

67. Alarcon-Aguilar FJ, Zamilpa A, Perez-Garcia MD, Almanza-Perez JC, Romero-Nunez E, Campos-Sepulveda EA, et al. Effect of Hibiscus sabdariffa on obesity in MSG mice. *J Ethnopharmacol.* 2007;114(1):66-71.
68. Aziz Z, Wong SY, Chong NJ. Effects of Hibiscus sabdariffa L. on serum lipids: A systematic review and meta-analysis. 2013. p. 442-50.
69. Perez-Torres I, Ruiz-Ramirez A, Banos G, El-Hafidi M. Hibiscus Sabdariffa Linnaeus (Malvaceae), Curcumin and Resveratrol as Alternative Medicinal Agents Against Metabolic Syndrome. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry.* 2013;11(1):25-37.
70. Mardiah, Zakaria FR, Prangdimurti E, Damanik R. Anti-inflammatory of Purple Roselle Extract in Diabetic Rats Induced by Streptozotocin. *Procedia Food Science.* 2015;3:182-9.
71. Mileo AM, Nistico P, Miccadei S. Polyphenols: Immunomodulatory and Therapeutic Implication in Colorectal Cancer. *Front Immunol.* 2019;10:729.
72. Rodriguez-Ramiro I, Vauzour D, Minihane AM. Polyphenols and non-alcoholic fatty liver disease: impact and mechanisms. *Proc Nutr Soc.* 2016;75(1):47-60.
73. Z.M. Salem M, Olivares-Pérez J, A.Z.M S. Studies on biological activities and phytochemicals composition of Hibiscus species- A review. *Life Science Journal.* 2014;11:1-8.
74. Villalpando-Arteaga EV, Mendieta-Condado E, Esquivel-Solis H, Canales-Aguirre AA, Galvez-Gastelum FJ, Mateos-Diaz JC, et al. Hibiscus sabdariffa L. aqueous extract attenuates hepatic steatosis through down-regulation of PPAR-gamma and SREBP-1c in diet-induced obese mice. *Food Funct.* 2013;4(4):618-26.
75. Melchert A, Rosa AC, Genari V, Frontana MSG, Reis RPd, Okamoto PTC, et al. Effect of Hibiscus sabdariffa Supplementation on Renal Function and Lipidic Profile in Obese Rats. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances.* 2016;11(11):693-700.
76. Huang TW, Chang CL, Kao ES, Lin JH. Effect of Hibiscus sabdariffa extract on high fat diet-induced obesity and liver damage in hamsters. *Food Nutr Res.* 2015;59(February):29018.
77. Sabzghabae AM, Ataie E, Kelishadi R, Ghannadi A, Soltani R, Badri S, et al. Effect of Hibiscus sabdariffa Calices on Dyslipidemia in Obese Adolescents: A Triple-masked Randomized Controlled Trial. *Mater Sociomed.* 2013;25(2):76-9.
78. Da-Costa-Rocha I, Bonnlaender B, Sievers H, Pischel I, Heinrich M. Hibiscus sabdariffa L. - a phytochemical and pharmacological review. *Food Chem.* 2014;165:424-43.
79. Hansawasdi C, Kawabata J, Kasai T. Alpha-amylase inhibitors from roselle (Hibiscus sabdariffa Linn.) tea. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2000;64(5):1041-3.
80. Norheim F, Hasin-Brumshtein Y, Vergnes L, Chella Krishnan K, Pan C, Seldin MM, et al. Gene-by-Sex Interactions in Mitochondrial Functions and Cardio-Metabolic Traits. *Cell Metab.* 2019;29(4):932-49 e4.
81. Naff'ah. Respons Akut dan Kronik FGF21 Akibat Latihan Fisik yang Diinduksi Diet Tinggi Lemak : Kajian pada Serum, Otot Rangka dan Jaringan Adiposa Putih. Jakarta2018.
82. Rabia. Kadar Irisin Serum, Jaringan Adiposa, dan Otot Rangka pada Tikus Diet Tinggi Lemak yang Diberi Latihan Fisik Intensitas Tinggi Intermiten dan Intensitas Sedang Kontinyu. Jakarta2018.
83. Andraini T, Yolanda S. Prevention of insulin resistance with Hibiscus sabdariffa Linn. extract in high-fructose fed rat. *Medical Journal of Indonesia.* 2015;23(4):192-6.
84. Kartinah N, Fadilah F, Ilyas E, Suryati Y. The Potential of Hibiscus sabdariffa Linn in Inducing Glucagon-Like Peptide-1 via SGLT-1 and GLPR in DM Rats. *BioMed Research International.* 2019;2019:1-8.
85. Kartinah N, Komara N, Sianipar I, Noviati N. The Potential of Hibiscus sabdariffa Linn. for Treatment of Obesity: Focus on FGF21 in Liver and Adipose Tissue. *eJournal Kedokteran Indonesia.* 2019;7.
86. Ilyas E, Irawati D, Elfiza D, Nurlaela C, Jusman S, Kartinah N. The potency of hibiscus sabdariffa linn. on decreased memory function related to the level of bdnf and creb in hippocampus of overtrained rats. *International Journal of Recent Scientific Research.* 2017;08:17097-103.

87. Zhang WX, Fan J, Ma J, Rao YS, Zhang L, Yan YE. Selection of Suitable Reference Genes for Quantitative Real-Time PCR Normalization in Three Types of Rat Adipose Tissue. *Int J Mol Sci.* 2016;17(6):968-.
88. Motawi TK, Shaker OG, Ismail MF, Sayed NH. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma in Obesity and Colorectal Cancer: the Role of Epigenetics. *Sci Rep.* 2017;7(1):10714.
89. Zuo J, Zhao D, Yu N, Fang X, Mu Q, Ma Y, et al. Cinnamaldehyde Ameliorates Diet-Induced Obesity in Mice by Inducing Browning of White Adipose Tissue. *Cell Physiol Biochem.* 2017;42(4):1514-25.
90. Liu M, Zhu H, Dai Y, Pan H, Li N, Wang L, et al. Zinc-alpha2-Glycoprotein Is Associated with Obesity in Chinese People and HFD-Induced Obese Mice. *Front Physiol.* 2018;9:62.
91. Kim HK, Kim JN, Han SN, Nam JH, Na HN, Ha TJ. Black soybean anthocyanins inhibit adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Nutr Res.* 2012;32(10):770-7.
92. Khalilpourfarshbafi M, Gholami K, Murugan DD, Abdul Sattar MZ, Abdullah NA. Differential effects of dietary flavonoids on adipogenesis. *European Journal of Nutrition.* 2019;58(1):5-25.
93. Zhao L, Cen F, Tian F, Li MJ, Zhang Q, Shen HY, et al. Combination treatment with quercetin and resveratrol attenuates high fat diet-induced obesity and associated inflammation in rats via the AMPKalpha1/SIRT1 signaling pathway. *Exp Ther Med.* 2017;14(6):5942-8.
94. Lee SG, Parks JS, Kang HW. Quercetin, a functional compound of onion peel, remodels white adipocytes to brown-like adipocytes. *J Nutr Biochem.* 2017;42:62-71.
95. Kalinovich AV, de Jong JM, Cannon B, Nedergaard J. UCP1 in adipose tissues: two steps to full browning. *Biochimie.* 2017;134:127-37.
96. Zhang X, Li X, Fang H, Guo F, Li F, Chen A, et al. Flavonoids as inducers of white adipose tissue browning and thermogenesis: signalling pathways and molecular triggers. *Nutrition & metabolism.* 2019;16:47-.
97. Zhang H, Guan M, Townsend KL, Huang TL, An D, Yan X, et al. MicroRNA-455 regulates brown adipogenesis via a novel HIF1an-AMPK-PGC1alpha signaling network. *EMBO Rep.* 2015;16(10):1378-93.
98. Jeon SM. Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. *Exp Mol Med.* 2016;48(7):e245.
99. Kartinah NT, Sianipar IR. High Intermittent Intensity Training Induces FGF21 Secretion in Obese Rats. 2018;1(1):1-3.
100. Tine Kartinah N, Rosalyn Sianipar I, Nafi'ah, Rabia. The Effects of Exercise Regimens on Irisin Levels in Obese Rats Model: Comparing High-Intensity Intermittent with Continuous Moderate-Intensity Training. *BioMed research international.* 2018;2018:4708287-.
101. Shin S, Ajuwon KM. Effects of Diets Differing in Composition of 18-C Fatty Acids on Adipose Tissue Thermogenic Gene Expression in Mice Fed High-Fat Diets. *Nutrients.* 2018;10(2).
102. Klingenberg M. UCP1 - A sophisticated energy valve. *Biochimie.* 2017;134:19-27.
103. Pahlavani M, Razafimanjato F, Ramalingam L, Kalupahana NS, Moussa H, Scoggin S, et al. Eicosapentaenoic acid regulates brown adipose tissue metabolism in high-fat-fed mice and in clonal brown adipocytes. *J Nutr Biochem.* 2017;39:101-9.
104. Radhina A. Regulasi ekspresi gen UCP-1 melalui PRDM16 dan miR-133a pada tikus obes yang diberikan ekstrak Hibiscus sabdariffa Linn. [Tesis]. Jakarta: Universitas Indonesia; 2019.

## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Surat Lulus Kaji Etik

	<b>UNIVERSITAS INDONESIA</b>	Gedung Fakultas Kedokteran UI Jl. Salemba Raya No.6, Jakarta 10430 PO.Box 1358
	<b>FAKULTAS KEDOKTERAN</b>	T. 62.21.3912477, 31930371, 31930373, 3922977, 3927360, 3153236 F. 62.21.3912477, 31930372, 3157288 E. <a href="mailto:humas@fk.ui.ac.id">humas@fk.ui.ac.id</a> , <a href="mailto:offices@fk.ui.ac.id">offices@fk.ui.ac.id</a> <a href="http://fk.ui.ac.id">fk.ui.ac.id</a>

Nomor : 0110 /UN2.F1/ETIK/2018

**KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK**

---

*ETHICAL APPROVAL*

Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul:

*The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, University of Indonesia, with regards of the Protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the research protocol entitled:*

**"Potensi *Hibiscus sabdariffa* Linn. terhadap *Beiging Process*: Kajian Molekuler pada Tikus Obese".**  
No. protokol: 18-02-0119

Peneliti Utama : Dr.dr. Neng Tine Kartinah, M.Kes, AIFO  
*Principal Investigator*

Nama Institusi : Ilmu Biomedik FKUI  
*Name of the Institution*

dan telah menyetujui protokol tersebut di atas  
*and approves the above mentioned protocol.*



05 FEB 2018  
Ketua  
Chairman  
  
**Prof. Dr. dr. Rianto Setiabudy, SpFK**

\* *Ethical approval* berlaku satu tahun dari tanggal persetujuan.  
\*\* Peneliti berkewajiban

1. Menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian
2. Memberitahukan status penelitian apabila
  - a. Setelah masa berlakunya keterangan lolos kaji etik, penelitian masih belum selesai, dalam hal ini *ethical approval* harus diperpanjang.
  - b. Penelitian berhenti di tengah jalan
3. Melaporkan kejadian serius yang tidak diinginkan (*serious adverse events*).
4. Peneliti tidak boleh melakukan tindakan apapun pada subyek sebelum protokol penelitian mendapat lolos kaji etik dan sebelum memperoleh *informed consent* dari subyek penelitian.
5. Menyampaikan laporan akhir, bila penelitian sudah selesai
6. Cantumkan nomor protokol ID pada setiap komunikasi dengan KEPEK FKUI-RSCM

**Lampiran 2. Dokumentasi Penelitian Pemeliharaan tikus di kandang**



**Pengukuran berat pakan tikus**



**Pemindahan dan pengukuran tikus**



**Pembuatan sediaan ekstrak *H. sabdariffa***





**Penyimpanan dan pemindahan ekstrak *H. sabdariffa* sebelum diberikan ke tikus****Pemberian ekstrak *H. sabdariffa*****Pembedahan dan pengambilan jaringan adiposa**

**Proses pemeriksaan sampel di laboratorium**



**Penyimpanan kit dan sampel di kulkas**





Lampiran 3. Sertifikat Pengujian Ekstrak *H. sabdariffa*

Kementerian Pertanian  
Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian  
Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat  
Laboratorium Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat  
Jalan Tentara Pelajar No. 3 Kampus Penelitian Pertanian Cimanggu, Bogor 16111  
Telepon : (0251) 8321879 Faximile : (0251) 8327010 E-mail : balitro@setra.go.id

**SERTIFIKAT PENGUJIAN**  
CERTIFICATE OF ANALYSIS  
No. Adm. : 559/T/LAB/VIII/17

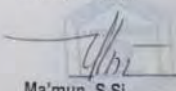
DF 5.10.1.2

Kepada Yth  
**Dr. dr. Ermita Isfandiary**  
FK Universitas Indonesia

Kondisi / Identifikasi Contoh : Simplisia  
Tanggal Penerimaan : 25 Agustus 2017  
Tanggal Pengujian : 25 – 28 Agustus 2017

No	Jenis Contoh	Jenis Pengujian / Pemeriksaan	Hasil Pengujian /Pemeriksaan (No. contoh/kode)	Metode Pengujian
1.	Rosella	- Ekstrak Metanol Rendemen (%)	33,03	Maserasi

Bogor, 28 Agustus 2017  
Manajer Teknis

  
**Ma'mun, S.Si**

- Laporan hasil uji ini berlaku selama 30 hari sejak diterbitkan. Surat memuat agar mencantumkan nomor administrasi.  
- Hasil Pengujian / di atas hanya berdasarkan contoh uji yang bersangkutan. Laporan ini dilarang diperbanyak kecuali atas persetujuan tertulis dari Laboratorium Pengujian / Balitro.

Lembar kedua disimpan oleh Manajer Administrasi

Lampiran 4. Laporan Hasil Pengujian Ekstrak *H. sabdariffa*

**UNIVERSITAS INDONESIA**  
**FAKULTAS KEDOKTERAN**

Gedung Fakultas Kedokteran UI  
Jl. Salemba Raya No.5, Jakarta 10430  
PO.Box 1358  
T. 62.21.3912477, 31930371, 31930373,  
3922977, 3927360, 3153236,  
F 62 21 3912477, 31930372, 3157288,  
E. humas@fk.ui.ac.id, office@fk.ui.ac.id  
fk.ui.ac.id

**Laporan Hasil Pengujian**

No: 407 /UN2.F1.D/KIMIA/PPM.00.03/2018

**Pelanggan**

Nama : Dr. dr. Neng Tine Kartinah, M.Kes, AIFO  
Alamat : Departemen Fisiologi Fakultas Kedokteran UI  
Salemba Raya No 4 Jakarta Pusat  
Telepon : 087886681145

**Contoh Uji**

Nama barang : Ekstrak metanol *Hibiscus sabdariffa*  
Diterima : 07 Agustus 2018  
Tanggal Uji : 20 Agustus 2018

**Hasil Uji**

No.	Parameter	Unit	Hasil	Metode
1.	Rendemen Ekstrak	%	34,68	Maserasi
2.	Uji Fitokimia			
	Flavonoid		+	Willstater
	Saponin		+	Depkes
	Alkaloid		+	Culvenor Fotzgeral
	Steroid		-	Lieberman-Burchard
	Terpenoid		-	Robinson
	Tanin		+	Lieberman-Burchard
	Fenol		+	
3.	Flavonoid total			Chang (Spektroskopi UV-Vis)
	flavonoid total = (Konsentrasi x Vol. Ekstrak x 100) / Berat ekstrak	% (b/b)	0.28 ± 0.95	
4.	Fenolik total	% (b/b)	1.72 ± 0.45	Spektroskopi UV-Vis

Keterangan: + = mengandung senyawa yang diuji - = tidak mengandung senyawa yang diuji

Jakarta, 5 Desember 2018

Kepala Laboratorium Kimia Kedokteran FKUI

Dr. Ade Arsianti, S.Si, M.Si

NIP 197204101998022001

**Lampiran 5. Hasil Analisa Kadar Air Ekstrak *H. sabdariffa***

**HASIL ANALISA**  
**LABORATORIUM ILMU FARMASI KEDOKTERAN-FKUI**

---

Nama Periset : dr. Jules-S2 Fisiologi  
Nama Sampel : Ekstrak Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)


Hasil:

NO	Analisis	Hasil
1.	Kadar air ekstrak Rosella	30.27%

Jakarta, 21 Februari 2018  
Koordinator Penelitian  
Departemen Ilmu Farmasi Kedokteran

  
Prof. Dr. dr. Erni H Purwaningsih, MS  
NIP. 195305161980032001

## Lampiran 6. Hasil Analisa Pakan Tikus


**PUSAT PENELITIAN SUMBERDAYA HAYATI DAN BIOTEKNOLOGI**  
**LEMBAGA PENELITIAN DAN PEMBERDAYAAN MASYARAKAT**  
**INSTITUT PERTANIAN BOGOR**  
 Jl. Kampoer Kampus IPB Darmaga-Bogor 16680  
 Telp.: (0251) 8621257, 8621724 Fax : (0251) 8621724, e-mail : paubfip@indo.net.id

---

**HASIL ANALISA PROKSIMAT**  
**No. 226/L. T. 3/PM/2017**


Nama : Rabia  
Jenis Sampel : Pellet


No	Kode Sampel	Kadar air	Abu	Lemak	Protein	Serat kasar
		%				
1	A	3,60	5,54	19,09	24,00	4,86
2	B	3,84	6,26	6,43	23,60	3,91

Ket : Hasil dihitung berdasarkan sampel yang di terima (segar)

Bogor, 17 Juli 2017  
Penanggung jawab.

Analisis,

  
 Endang Rusmalia, A.Md.  
 NIP. 19771106 200710 2 001

  
 Prof. Dr. Komang G. Wiryawan  
 NIP. 19610914 198703 1 002

### Lampiran 7. Cara perhitungan dosis dan pemberian sediaan ekstrak *H. sabdariffa*

Berikut adalah cara perhitungan dosis dan pemberian sediaan ekstrak *H. sabdariffa*:

#### A. Diketahui:

- Dosis  $= 200 \text{ mg/kg BB} = 200 \text{ mg/1000 g BB}$   
 $= 400 \text{ mg/kg BB} = 400 \text{ mg/1000 g BB}$
- Estimasi berat tikus  $= 350 \text{ g}$
- Kadar air ekstrak  $= 30,27\%$
- Kadar ekstrak metanol *H. sabdariffa*  $= 100\% - 30,27\% = 69,73\%$   
 $= 69370 \text{ mg/100 ml}$
- Kadar sediaan yang diinginkan  $= 10\% = 100 \text{ mg/ml}$

#### B. Sediaan harian:

- Kebutuhan dosis ekstrak/ekor/hari:
  - $= \text{estimasi BB tikus/ekor} \times \text{dosis}$
  - $= 350 \text{ g} \times 200 \text{ mg/1000 g BB} = 70 \text{ mg}$
  - $= 350 \text{ g} \times 400 \text{ mg/1000 g BB} = 140 \text{ mg}$
- Jumlah ekstrak yang diberikan/ekor/hari:  $\frac{\text{kebutuhan dosis / ekor / hari}}{\text{kadar sediaan yang diinginkan}} \times 1 \text{ ml}$ 

Dosis 200 mg/kg BB $= \frac{70 \text{ mg}}{100 \text{ mg/ml}} \times 1 \text{ ml} = 0,7 \text{ ml}$	Dosis 400 mg/kg BB $= \frac{140 \text{ mg}}{100 \text{ mg/ml}} \times 1 \text{ ml} = 1,4 \text{ ml}$
--	---
- Total kebutuhan sediaan/hari untuk 36 ekor tikus:
 

Dosis 200 mg/kg BB $= 0,7 \text{ ml} \times 36$ $= 25,2 \text{ ml}$	Dosis 400 mg/kg BB $= 1,4 \text{ ml} \times 36$ $= 50,4 \text{ ml}$
---	---
- Kebutuhan ekstrak /hari:  $V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$   
 Dosis 200 mg/kg BB:  
 $V_1 \times 69730 \text{ mg/100 ml} = 25,2 \text{ ml} \times 100 \text{ mg/ml}$

$$V_1 = \frac{25,2 \text{ ml} \times 100 \text{ mg/ml}}{69730 \text{ mg} / 100 \text{ ml}}$$

$$V_1 = 3,61 \text{ ml}$$

Dosis 400 mg/kg BB:

$$V_1 \times 69730 \text{ mg}/100 \text{ ml} = 50,4 \text{ ml} \times 100 \text{ mg/ml}$$

$$V_1 = \frac{50,4 \text{ ml} \times 100 \text{ mg/ml}}{69730 \text{ mg} / 100 \text{ ml}}$$

$$V_1 = 7,22 \text{ ml}$$

- Kebutuhan akuabides

Dosis 200 mg/kg BB

$$= 25,2 \text{ ml} - 3,61 \text{ ml}$$

$$= 21,59 \text{ ml akuabides}$$

Dosis 400 mg/kg BB

$$= 50,4 \text{ ml} - 7,22 \text{ ml}$$

$$= 43,18 \text{ ml akuabides}$$

Jadi untuk membuat sediaan ekstrak *H. sabdariffa* dosis 200 mg/kg BB dibutuhkan sebanyak 3,61 ml ekstrak metanol *H. sabdariffa* yang dilarutkan dengan 21,59 ml akuabides. Sedangkan untuk dosis 400 mg/kg BB dibutuhkan sebanyak 7,22 ml ekstrak metanol *H. sabdariffa* yang dilarutkan dengan 43,18 ml akuabides. Selanjutnya, sediaan ekstrak diberikan sesuai dengan berat badan tikus.

**Lampiran 8. Bukti Submit Artikel**



**Lampiran 9. Draft Artikel****Journal Of Obesity****The Potential of *Hibiscus sabdariffa* Linn in Handling FGF21 Resistance in Obese Rats via the FGF21 Receptor and miR-34a**

Neng Tine Kartinah,<sup>1</sup> Nisa Kartika Komara<sup>2</sup>, Nuraini Diah Noviati<sup>2</sup>, Afifa Radhina<sup>2</sup>, Heriyanto<sup>2</sup>, Syarifah Dewi<sup>3</sup>, Sophie Yolanda<sup>1</sup>, Imelda Rosalyn Sianipar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Physiology, Faculty of Medicine Universitas Indonesia, Jakarta, 10430, Indonesia.

<sup>2</sup>Master Program in Biomedical Sciences, Faculty of Medicine Universitas Indonesia, Jakarta, 10430, Indonesia.

<sup>3</sup>Departement of Biochemistry, Faculty of Medicine Universitas Indonesia, Jakarta, 10430, Indonesia

Correspondence should be addressed to Neng Tine Kartinah; [tine.kartinah@ui.ac.id](mailto:tine.kartinah@ui.ac.id)

*Background.* Obesity is a cause of FGF21 resistance, which plays a role in the tanning and thermogenesis process. FGF21 resistance is the result of decreased receptor expression, which results in a reduced number of bonds between FGF21 and its receptors in adipose tissue. Decreased receptor expression is influenced by miR-34a, which is increased in obesity. While FGF21-based therapies have been widely investigated, the potential activity of *Hibiscus sabdariffa* Linn extract (*H. sabdariffa*) against FGF21 resistance is unknown. This study aims to determine the effects of *H. sabdariffa* on the expression of miR-34a and FGF21 receptors in white adipose tissue. *Methods.* This experimental study used 24 male Sprague-Dawley rats (*Rattus norvegicus* L) aged 6-10 weeks divided into four groups: normal (N), obese



## 1. Introduction

Obesity causes systemic low grade inflammation which will have an impact on tissue disruption. Systemic low grade inflammation is caused by an increase in proinflammatory cytokines due to hypoxia of adipose tissue. Cell hypertrophy will cause hypoxia of adipose tissue resulting in macrophage infiltration and changing the phenotype of anti-inflammatory macrophages (M2) to pro-inflammatory macrophages (M1) (1).

One of the effects of chronic inflammation is the increased expression of microRNA that functions as the mRNA induce silencing complex of the target gene (2). Proinflammatory cytokines such as TNF $\alpha$ , IL6 will increase the expression of microRNA like miR-34a. In obesity, the expression of miR-34a was found to increase significantly miR-34a functions as a regulator of FGFR1 receptor expression and beta-klotho coreceptor that will bind to FGF21. According to Fu (2016), miR-34a can disturb the FGF21 signaling cascade of white adipose tissue through downregulation of FGFR receptor expression and beta-klotho co-receptor. Disruption of the FGF21 signalling cascade will result in FGF21 resistance in white adipose tissue (3).

FGF21, a member of the fibroblast growth factor (FGF) family located on chromosome 19, is expressed by several organs, including the liver. FGF21 plays a role in controlling the body's energy homeostasis through regulation of adipose tissue browning and thermogenesis. FGF21 in carrying out this role must bind to its receptors in adipose tissue, namely FGFR1 and beta-klotho. The complex binding of FGF21 with its receptors and receptor in adipose tissue will activate the signaling pathway through the Ras/Raf

MAPK. FGF21 induces adipose tissue browning through increased expression of UCP-1 which plays a role in thermogenic which further increases thermogenesis. FGF21 binding with its receptor will form a signal transduction that increases the activity of Sirtuin-1 (SIRT1), then stimulates PGC1 $\alpha$  to increase the expression of UCP1 (3–5).

With respect to the potential of FGF21 in browning and thermogenesis, efforts are underway to address work-based obesity through FGF21. Kartinah et al. (2018) found that high-intensity intermittent physical exercise can increase the amount of FGF21 released from muscle, and thereby increase its activity in adipose tissue (6). Sonoda et al. (2017) reviewed from many in vivo experiments showed FGF21 analogues and FGFR agonists that resemble the FGF21 receptor ligand complex (7). However, it is still necessary to manage obesity using natural ingredients. Natural ingredients that have the potential to handle obesity include *Hibiscus sabdariffa* Linn. (*H. sabdariffa*), otherwise known as rosela (8–11).

*H. Sabdariffa* contains flavonoids, quercetin, polyphenols, catechins, and anthocyanins (10–13). The polyphenols in *H. sabdariffa* prevented weight gain in obese rats (9). This *H. sabdariffa* can inhibit lipogenesis in white adipose tissue has been explained at the molecular level.

However, the potential activity of *H. sabdariffa* against FGF21 resistance is still unknown. This study aims to assess the potential for *H. sabdariffa* to act against FGF21 resistance by measuring its receptors in adipose tissue (FGFR1 and beta-klotho) and quantifying antagonist miR-34a in obese rats.

## 2. Method

### 2.1 Study and Design

Twenty four male Sprague-Dawley rats (6- 10 weeks age) were randomized to 4 groups according to extract dosage and metabolic conditions (normal/obese). The groups are (1) control group (N), (2) obese (Ob) group, (3) obese group administered *H. sabdariffa* 200 mg/day/kgBW (Ob-Hib200), and (4) obese group administered *H. sabdariffa* 400 mg/day/kgBW (Ob-Hib400).

The condition of the obese rats was induced were administered high-fat diet (19.09% Fat, 24.00% Protein) and normal control group fed with standard diet. Rats were categorized as obese if their Lee index was more than 310. After being given a high-fat diet for 17 weeks, rats were included on the obesity list. The following is the formula for measuring the Lee index:

$$\text{Lee index} = \frac{\sqrt[3]{\text{body weight}}}{\text{body length}} \times 1000$$

Obese rats were included in either the obese (O) group, the obese group given *H. sabdariffa* 200 mg/day/kgBW (Ob-Hib200) or the obese group given *H. sabdariffa* 400 mg/day/kgBW (Ob-Hib400). The high-fat diet continued until the end of the study.

### 2.2 Animals

All experiments were approved by the Ethical Committee of Faculty of Medicine, Universitas Indonesia, 24 male Sprague-Dawley rats (Balitbangkes, Jakarta), 6-10

weeks old, were housed in proportion 3 rats per cage with a 12h:12h light/dark cycle.

### 2.3 Provision of *H. sabdariffa* Methanol Extract

The simplicia of *H. sabdariffa* plants was obtained from the Center for Biopharmaceutical Studies at Bogor Agricultural University. Extraction was performed using maceration with methanol. Dilution of the extract was based on 7 days of treatment. After dilution the preparation was stored at 4°C. Rats that would be given *H. sabdariffa* extract had to be weighed to determine the amount of extract to be given. *H. sabdariffa* was administered orally using a gastric sonde once a day for 5 consecutive weeks in the Ob-Hib 200 and Ob-Hib 400 groups.

### 2.4 Sampling Technique

Decapitation was performed following anesthesia using a combination of xylazine hydrochloride 0.01 ml/kgBW and 0.05 ml/kgBW ketamine. Rats were fasted for 12 hours prior to decapitation. The rats were then dissected and adipose tissue was harvested. The sample was put into a pot and stored in a refrigerator at a temperature of minus 80 °C.

### 2.5. Measurement of FGFR1, beta-klotho and miR-34a Gene Expression of Adipose Tissue

FGFR1 and beta-klotho gene expression was quantified through several stages, namely: 1) RNA isolation using the Quick-RNA MiniPrep Plus (Zymo Research) kit, 2)

Synthesis of cDNA using the cDNA synthesis kit and a ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA remover (Toyobo). The RNA template used for cDNA synthesis was RNA that was successfully isolated in the previous process. Previous RNA concentrations were measured using a nano drop, and dilutions to obtain the required RNA concentration were performed using nuclease free water. 3) Real-time PCR was performed in triplicate to measure the expression of FGFR1 and beta-klotho genes using the SensiFAST SYBR Hi-ROX Kit (Bioline) kit with a two-step method.

Gene expression was then analyzed using the Microdrop VarioSkan Spectrophotometer. Primers used to measure the expression of the FGFR1 receptor, beta-klotho and a housekeeping gene are in Table 1. RNA isolation was performed to obtain the RNA necessary for examining miR-34a

gene expression. Total RNA isolation from adipose tissue was performed using the Quick-RNA MiniPrep Plus (Zymo Research) kit. cDNA synthesis was performed so that miRNA could be amplified during real time PCR. Real time PCR was performed in triplicate using the miR- 34a Detection and U6 Calibration Kit (Cohesion Biosciences)

## 2.6 Data Analysis

A normality test using the Shapiro-Wilk test was conducted on the collected data. If the data were normally distributed, parametric tests using a one-way analysis of variance (ANOVA) were conducted, and if the data were not normal and remained abnormal after transformation, a nonparametric test was carried out using the Kruskal-Wallis test. A p value <0.05 was considered statistically significant. Data processing was carried out using the SPSS 23 computer program (Statistical Social Sciences 23)Table1: Gene Primer

Primer	Forward	Reverse	Gene accession number
FGFR1	5'- CGGAGGCTACAAGGTTTCGTT-3'	5'-ACGGTCTTGTTGGCTGGTAG-3'	NM_024146.1
Beta-Klotho	5'- ACGGCTGGTTCACAGATAGTT-3'	5'-TAGGCATCCTGCCACTCAA-3'	XM_017599543.1
Housekeeping gene GAPDH	5'- TGCCACTCAGAAGACTGTGG-3'	5'- TTCAGCTCTGGGATGACCTT-3'	NM_017008.4

### 3. Results

#### 3.1. The Effects of *H. sabdariffa* on Index Lee of The Obese Rat

Based on the results in figure 1, the index of the obese group was the highest and significantly different from the normal group and the obese group given *H. sabdariffa* at doses of 200 mg/kg and 400 mg/kg. ( $p < 0.05$ ). In addition, the administration of *H. sabdariffa* dose 200mg/KgBW and 400mg/KgBW below 310. This indicates that the administration of *H. sabdariffa* can reduce the level of lee to normal limits.

#### 3.2 The Effects of *H. sabdariffa* on miR-34a of White Adipose Tissue

Based on the results of the ANOVA statistical test there was an increase in the expression of miR-34a in the obese group compared with controls ( $p < 0.001$ ). The administration of *H. sabdariffa* extract at a dose of 200 mg/kgBW/day was not able to reduce the expression of miR-34a ( $p > 0.05$ ), while the administration of extracts at 400 mg/kgBW reduced miR-34a expression ( $p < 0.001$ ) to levels equivalent to controls ( $p > 0.05$ )

#### 3.3 The Effects of *H. sabdariffa* on FGFR1 of White Adipose Tissue

FGFR1 gene expression in adipose tissue can be seen in Figure 18. The expression of the FGFR1 gene in obese rats was decreased compared to FGFR1 levels in the normal control group ( $p < 0.01$ ). The administration of *H. sabdariffa* extract in obese 400 mg/kgBW rats was able to maintain the expression of FGFR1 at levels equivalent to controls

( $P > 0.05$ ). The expression of FGFR1 in the obese group given *H. sabdariffa* 400 mg/kgBW was significantly different from the obese untreated group ( $p < 0.05$ ).

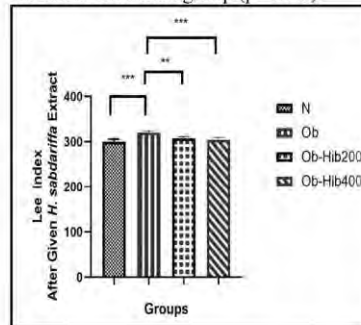


Figure 1. Average Index Lee. Data is depicted as mean  $\pm$  SD. There were significant differences (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ); N: Normal controls without *H. sabdariffa*; Ob: Obese untreated rats; Ob-Hib 200: Obese rats administered *H. sabdariffa* at a dose of 200 mg/kgBW; Ob-Hib 400: Obese rats administered it at a dose of 400 mg/kgBW.

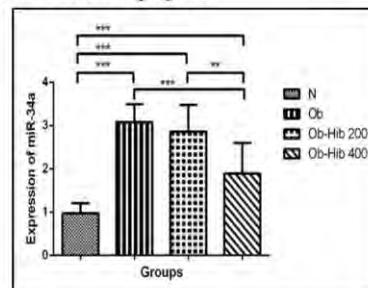


Figure 2. Average miR-34a expression. Data is depicted as mean  $\pm$  SD. There were significant differences (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ); N: Normal controls without *H. sabdariffa*; Ob: Obese untreated rats; Ob-Hib 200: Obese rats administered HSE at a dose of 200 mg/kgBW; Ob-Hib 400: Obese rats administered HSE at a dose of 400 mg/kgBW.

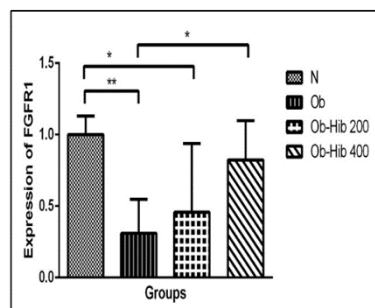


Figure 3. Average FGFR1 expression. Data is depicted as mean  $\pm$  SD. There were significant differences (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ); N: Normal controls without *H. sabdariffa*; Ob: Obese untreated rats; Ob-Hib 200: Obese rats administered it at a dose of 200 mg/kgBW; Ob-Hib 400: Obese rats administered HSE at a dose of 400 mg/kgBW.

#### 3.4 The Effects of *H. sabdariffa* on Beta-Klotho of White Adipose Tissue

Beta-klotho gene expression in adipose tissue can be seen in Figure 19, which shows that the expression of the beta-klotho gene in obese rats was decreased compared to the normal group ( $p < 0.001$ ). However, the administration of *H. sabdariffa* extract at a dose of 400 mg/kgBW in obese rats can increase the expression of the beta-klotho gene significantly different from the obese groups given *H. sabdariffa* 200 mg/kgBW ( $p < 0.05$ ). This was evidenced by the increased expression of beta-klotho in the group given a *H. sabdariffa* dose of 400 mg/kgBW compared with untreated obese rats ( $p < 0.001$ ). However, beta-klotho gene expression in obese rats treated with *H.*

*sabdariffa* at a dose of 400 mg/kgBW was still lower than in controls ( $p > 0.05$ ).

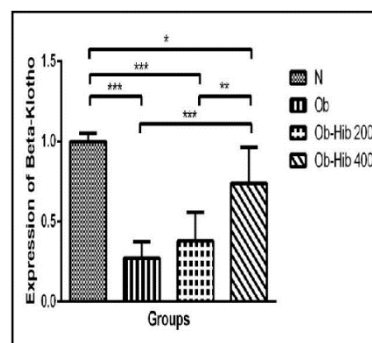


Figure 4. Average Beta-Klotho expression. Data is depicted as mean  $\pm$  SD. There were significant differences (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ); N: Normal controls without *H. sabdariffa*; Ob: Obese untreated rats; Ob-Hib 200: Obese rats administered it at a dose of 200 mg/kgBW; Ob-Hib 400: Obese rats administered HSE at a dose of 400 mg/kgBW.

#### 3.5 The Effects of *H. sabdariffa* on PGC1 $\alpha$ expression of White Adipose Tissue

PGC1 $\alpha$  gene expression in obese rats decreased compared with PGC1 $\alpha$  levels in the normal control group. The administration of *H. sabdariffa* extract to obese rats at a dose of 400 mg/kg body weight can increase PGC1 $\alpha$  expression when compared to the group in obese mice that are not induced by *H. sabdariffa*. However, administration of *H. sabdariffa* extract at a dose of 200 mg/kg body weight has not been able to increase PGC1 $\alpha$  expression, so that the levels are like the group of obese rats that are not induced by *H. sabdariffa*.

### 3.6 The Effects of *H. sabdariffa* on UCP 1 expression of White Adipose Tissue

Based on the results in the, the expression of the UCP1 gene in obese rats has decreased when compared to the normal control group. This was evidenced by the significant difference between the normal and obese control groups ( $p < 0.001$ ). The administration of *H. sabdariffa* extract at a dose of 200 mg/kg body weight and 400 mg/kg body weight also gave an increase in UCP1 gene expression when compared to the obese control group ( $p < 0.001$ ). Even the level of expression of the UCP1 gene reached levels as normal.

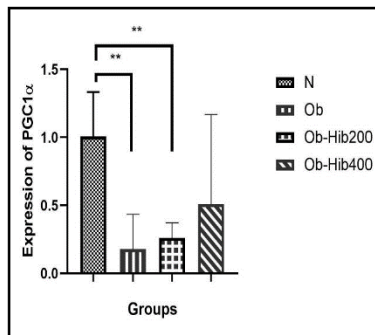


Figure 5. Average PGC 1 $\alpha$  expression. Data is depicted as mean  $\pm$  SD. There were significant differences (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ); N: Normal controls without *H. sabdariffa* ; Ob: Obese untreated rats; Ob-Hib 200: Obese rats administered it at a dose of 200 mg/kgBW; Ob-Hib 400: Obese rats administered it at a dose of 400 mg/kgBW.

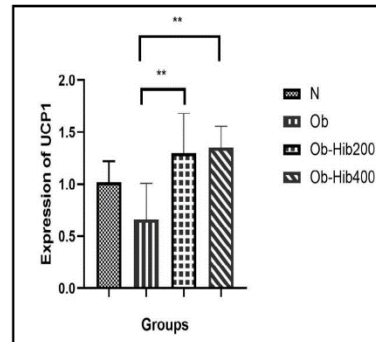


Figure 6. Average UCP1 expression. Data is depicted as mean  $\pm$  SD. There were significant differences (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ); N: Normal controls without *H. sabdariffa* ; Ob: Obese untreated rats; Ob-Hib 200: Obese rats administered it at a dose of 200 mg/kgBW; Ob-Hib 400: Obese rats administered it at a dose of 400 mg/kgBW.

## 4. Discussion

miR-34a in the obese group increased. This is in line with Ahmadpour et al. (2018) who finds miR-34a expression is increased in obese conditions (14). Increased relative expression of miR-34a in white adipose tissue in obesity has a relationship with the process of adipogenesis. Some miRNAs along with other adipogenesis master regulators, PPAR $\gamma$  and C / EBP, can increase the transcription of adipogenic genes. According to Francisco (2010), upregulation of miR-34a is followed by upregulation of expression of preadipocyte differentiation genes while downregulation of miR-34a causes a decrease in adipogenic gene expression(15).

Increased miR-34a will cause chronic inflammation (T. Fu et al). This is because miR-34a plays a role in suppressing the expression of the Klf4 gene, which causes infiltration of macrophage infiltration (3). Macrophage infiltration is associated with an increase in alpha TNF which causes chronic inflammation. TNF $\alpha$  produced by macrophages plays an important role in the regulation of adipokine in adipocytes. TNF $\alpha$  can induce pro-inflammatory cytokines through nuclear factor kappa B (NFKB). TNF- $\alpha$  works on TNF- $\alpha$  receptors in hypertrophic adipocyte tissue. then the bond will then induce the production of pro-inflammatory cytokines through an NF- $\kappa$ B-dependent -and -independent mechanism, which then induces that will cause the production of proinflammatory cytokines, such as IL-1 $\beta$ , and IL-6 (16–18).

This study did not measure the inflammatory cytokines that occur in obese conditions. However, this study shows the effects of chronic inflammation as evidenced by decreased FGFR and beta-klotho expression. This study is in line with the work of Gallego-Escuredo (2015) who reported that obesity resulted in led to the decreased expression of FGFR and beta-klotho receptors in white adipose tissue (19). Hale's research (2012) states that the expression of beta-klotho, FGFR-1c and FGFR2c ishas downregulated in the adipose tissue of in obese white rat (20). Delfin et al. (2012) jwho found that an decrease expression of FGFR1 and co-reseptor beta-klotho in obese mice. This has an impact on endocrine FGF21 communication in adsiPOSEA tissue, and is the beginning of the development of FGF21 resistance (16). FGF 21 resistance will be followed

by an increase in FGF 21 secretion in the liver(6). The results of previous studies have shown increased levels of FGF 21 in liver tissue. This is in line with Geng et al. (2019) who find that there was an increase in serum FGF21 levels in the obese group rats six times higher than in the normal group (15). Research by Morrice et al. (2017) shows that an increase in FGF21 levels in the liver in mice with FGF21 resistance (21).

This study shows that administration of *H. sabdariffa* can handle FGF 21 resistance through increased expression of FGFR and beta-klotho(22). This is because *H. sabdariffa* suggest to suppress miR-34a a as a regulator of FGFR and beta-klotho expressions(23,24). However, this study has not been able to prove the mechanism of Hib sabdariffa linn to downregulate MiR-34a a. Previous research has proven the potential evaluated of polyphenol compounds in other plant extracts that are microRNA modulatorsion. Baselga-Escudero et al. (2015) states found that proanthocyanin, a part component of polyphenols found in grapes and cocoa, is able to downregulate mir-33, which is useful in increasing the hepatic efflux of cholesterol and HDL in obese rats (25). In addition, these compounds can supress mir-122 which inhibit lipogenesis. Meanwhile Polyphenols from *H. sabdariffa* have been known to modulate mir-122, mir-103 and mir-107 in hyperlipidemic rats (26).

The potential of *H. sabdarifa* in suppressing miR-34a is suspected through the PPAR $\gamma$  and C / EBP expression. In addition, a decrease in PPAR $\gamma$  and C/EBP expression was associated with miR-34a suppression. According to Lavery (2016),

there was a decrease in the expression of PPAR $\gamma$  and C/EBP in rats with the miR-34a knockout rats (24). According to Kim (2007) *H. sabdariffa* can suppress transcription factors PPAR $\gamma$  differentiation and CEBP/ $\alpha$  (27). Thus, the inhibition of PPAR $\gamma$  and C/EBP as a result of the administration of *H. sabdariffa* administration has the potential to suppress the expression of miR-34a (28).

However, administration of *H. sabdariffa* in suppressing the expression of miR-34a is related to the dose. This study shows that the administration of *H. sabdariffa* at a dose of 200 mg/kg in obese conditions has not shown a significant reduction in miR-34a expression compared to the obese group. Whereas the administration of *H. sabdariffa* at a dose of 400 mg/KgBW was found to be significantly reduced in expression of miR-34a compared to the obese group. Although miR-34 levels have not reached normal levels, they have been able to increase beta-klotho and FGFR expression (29). Even increased FGFR1 expression reached levels as in the normal group.

This shows that increased expression of beta-klotho and FGFR can also be influenced by the potential of *H. sabdariffa* which directly suppresses chronic inflammation. Some studies have found that the content of Polyphenols from *H. sabdariffa* extract can inhibit proinflammatory by suppressing NF $\kappa$ B. Research by Zeng et al. (2016) find that polyphenols can increase the expression of FGFR1 and beta-klotho in rats fed a high-fat diet (30). That is because polyphenols can act as anti-inflammatory agents through decreasing nuclear factor  $\kappa$ B. In line with Gamboa-Gomez (2015), *H.*

*sabdariffa* extract significantly reduced TNF $\alpha$  induced by NF $\kappa$ B (31). In addition, the content of anthocyanins, namely cyanidin and delphinidin from *H. sabdariffa* extract can also reduce TNF $\alpha$  expression. That is because anthocyanin can inhibit the expression of nuclear factor  $\kappa$ B by inhibiting the degradation of I $\kappa$ B and also inhibiting the activation of I $\kappa$ B kinase, thereby preventing phosphorylation of nuclear factor  $\kappa$ B (16). This study did not measure NF $\kappa$ B levels, so it cannot directly prove the increase in beta-klotho and FGFR expression associated with decrease in NF $\kappa$ B.

This study proves the potential of *H. sabdariffa* in increasing the expression of GFR and beta-klotho so that it can handle FGF21 resistance in obese conditions (32). Handling of FGF 21 resistance is indicated by activation of the FGF 21 signaling pathway in adipose tissue. The FGF 21 binds with its receptor will activate signaling via PGC1 $\alpha$  which is a transcription coactivator to control energy metabolism. This study showed an increase in PGC1 $\alpha$  in the group given *H. sabdariffa* by 400 mg/KgBW. Increased PGC1 $\alpha$  activity is stimulated by SIRT1. After FGF21 binds to FGFR and beta-klotho, it induces browning from white adipose to beige adipose through the SIRT1 activation process, which results in PGC1  $\alpha$  deacetylation -1 $\alpha$ -induced UCP1 expression (5).

The results of this study also showed an increase in UCP 1 expression after *H. sabdariffa* administration. The increase in UCP 1 expression was not only in the group given *H. sabdariffa* 400 mg/KgBW but also in the group given 200 mg/KgBW. This is caused by the increase in UCP 1 expression not only affected by PGC1  $\alpha$



activation but also by other factors (30). UCP1 expression is influenced by several paths that are regulated by major transcription factors, such as PPAR $\gamma$ , and PRDM16 (33).

PPAR $\gamma$  is an important transcription factor in the differentiation of brown and white adipocytes. PPAR $\gamma$  is needed for the recruitment of PRDM16 to the PPAR $\gamma$  transcription complex, which will create the browning process (34). Thus, *H. sabdariffa* not only activates the PGC1 $\alpha$  pathway but is also thought to play a role in the PPAR $\gamma$  pathway, and PRDM16. However, further research is needed to prove it. In line with research Tian (2017) polyphenol content from green tea can improve transcriptional regulators for browning processes such as PPAR $\gamma$ , PGC1 $\alpha$ , PRDM16, and UCP1(35).

## 5. Conclusion

*H. sabdariffa* has the potential for to reverse handling FGF21 resistance in obese condie animalstions, because it is able toby means of suppressing the expression of miR-34a and increasing the number of FGFR1 receptors and beta-klotho coreceptors in adipose tissue. This will affect the active signaling of FGF 21 to in the process of produce browning and thermogenesis.

## Data Availability

The raw (excel) data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

## Conflict of Interest

The authors affirm no actual or potential conflicts of interest related with any

financial, personal or professional associations that could be perceived as interfering with the objectivity in this study.

## Acknowledgments

The authors would like to thank drg.Endang Winiati Bachtiar, M.Biomed, Ph.D., from Oral Biology Laboratory Universitas Indonesia for lab consultan and providing technical assistance. This research was funded by Hibah Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi 2019.

## Supplementary Materials

Supplementary Figure 1: Average Lee Index. Significance between the four groups was determined by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Supplementary Figure 2: Average miR-34a expression. Significance between the four groups was determined by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Supplementary Figure 3: Average FGFR expression. Significance between the four groups was determined by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Supplementary Figure 4: Average Beta-Klotho expression. Significance between the four groups was determined by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Supplementary Figure 5: Average PGC1 $\alpha$  expression. Significance between the four groups was determined by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Supplementary Figure 6: Average UCP1 expression. Significance between the four groups was determined by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

## References

1. Pan Y, Hui X, Chong Hoo RL, Ye D, Cheung Chan CY, Feng T, et al. Adipocyte-secreted exosomal microRNA-34a inhibits M2 macrophage polarization to promote obesity-induced adipose inflammation. *J Clin Invest* [Internet]. 2019;129(2):834–49. Available from: <https://doi.org/10.1172/JCI123069>; %0 D
2. Balasubramaniam M, Pandhare J, Dash C. Are microRNAs important players in HIV-1 infection? An update. *Viruses* [Internet]. 2018;10(3):1–35. Available from: doi:10.3390/v10030110
3. Fu T, Seok S, Choi S, Huang Z, Suino-Powell K, Xu HE, et al. MicroRNA 34a inhibits beige and brown fat formation in obesity in part by suppressing adipocyte fibroblast growth factor 21 signaling and SIRT1 function. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2014;34(22):4130–42. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25182532>
4. Fisher M, Kleiner S, Douris N, Fox EC, Mepani RJ, Verdegue F, et al. Adaptive thermogenesis FGF21 regulates PGC-1 $\alpha$  and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev* [Internet]. 2012;26(3):271–81. Available from: doi:10.1101/gad.177857.111
5. Crichton PG, Lee Y, Kunji ERS. The molecular features of uncoupling protein 1 support a conventional mitochondrial carrier-like mechanism. *Biochimie*. 2017;134:35–50.
6. Tine Kartinah N, Rosalyn Sianipar I, Nafi' Ah, Rabia R. The Effects of Exercise Regimens on Irisin Levels in Obese Rats Model: Comparing High-Intensity Intermittent with Continuous Moderate-Intensity Training. *Biomed Res Int* [Internet]. 2018;2018(2012). Available from: <https://doi.org/10.1155/2018/4708287>
7. Sonoda J, Chen MZ, Baruch A. FGF21-receptor agonists: an emerging therapeutic class for obesity-related diseases. *Horm Mol Biol Clin Investig* [Internet]. 2017;30(2):1–13. Available from: 10.1515/hmbci-2017-0002
8. Tee P-L, Yusof S, Mohamed S, Umar NA, Mustapha NM. Effect of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) on serum lipids of sprague dawley rats. *Nutr Food Sci* [Internet]. 2002;32(5):190–6. Available from: <https://www.emeraldinsight.com/doi/pdf/10.1108/00346650210445758>
9. Anna Sheba L, Illakia A. Anti obesity effect of *Hibiscus sabdariffa* L.: A review. *Int J Pharma Bio Sci* [Internet]. 2016;7(4):341–5. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/309474731f>
10. Riaz G, Chopra R. A review on phytochemistry and therapeutic uses of *Hibiscus sabdariffa* L. Vol. 102, *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2018. p. 575–86.
11. Morales-Luna E, Pérez-Ramírez IF, Salgado LM, Castaño-Tostado E, Gómez-Aldapa CA, Reynoso-Camacho R. The main beneficial effect of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) on obesity is not only related to its anthocyanin content. *J Sci Food Agric*. 2019;99(2):596–605.
12. Guardiola S, Mach N. Therapeutic potential of *Hibiscus sabdariffa*: A review of the scientific evidence. *Endocrinol y Nutr (English Ed)* [Internet]. SEEN; 2014;61(5):274–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.endoen.2014.04.003>
13. Alarcon-aguilar FJ, Zamilpa A, Perez-garcia MD, Almanza-perez JC, Romero-nu E, Vazquez-carrillo LI, et al. Effect of *Hibiscus sabdariffa* on obesity in MSG mice. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2007;114:66–71. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17765418>
14. Ahmadpour F. The Association of plasma levels of Mir-34A and Mir-149 with obesity and insulin resistance in obese children and adolescents. *Acta Endocrinol* [Internet]. 2018;25. Available from: doi: 10.4183/aeb.2018.149

15. Cuevas-Ramos D, Almeda-Valdés P, Meza-Arana CE, Brito-Córdova G, Gómez-Pérez FJ, Mehta R, et al. Exercise increases serum fibroblast growth factor 21 (FGF21) levels. *PLoS One*. 2012;7(5):1–8.
16. Diaz-Delfin J, Hondares E, Iglesias R, Giralt M, Caelles C, Villarroya F. TNF- $\alpha$  represses  $\beta$ -klotho expression and impairs FGF21 action in adipose cells: Involvement of JNK1 in the FGF21 pathway. *Endocrinology*. 2012;153(9):4238–45.
17. McArdle MA, Finucane OM, Connaughton RM, McMorrow AM, Roche HM. Mechanisms of obesity induced inflammation and insulin resistance: Insights into the emerging role of nutritional strategies. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 2013;4:1–23. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23675368>
18. Wang X, Cheng M, Zhao M, Ge A, Guo F, Zhang M, et al. Differential effects of high-fat-diet rich in lard oil or soybean oil on osteopontin expression and inflammation of adipose tissue in diet-induced obese rats. *Eur J Nutr*. 2013;52(3):1181–9.
19. Gallego-Escuredo JM, Gómez-Ambrosi J, Catalan V, Domingo P, Giralt M, Frühbeck G, et al. Opposite alterations in FGF21 and FGF19 levels and disturbed expression of the receptor machinery for endocrine FGFs in obese patients. *Int J Obes* [Internet]. 2015;39(1):121–9. Available from: doi:10.1038/ijo.2014.76
20. Hale C, Chen MM, Stanislaus S, Chinooswong N, Hager T, Wang M, et al. Lack of overt FGF21 resistance in two mouse models of obesity and insulin resistance. *Endocrinology* [Internet]. 2012;153(1):69–80. Available from: doi: 10.1210/en.2010-1262
21. Hondares E, Iglesias R, Giralt A, Gonzalez FJ, Giralt M, Mampel T, et al. Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *J Biol Chem* [Internet]. 2011;286(15):12983–90. Available from: doi:10.1074/jbc.M110.215889
22. BonDurant LD, Ameka M, Naber MC, Markan KR, Idiga SO, Acevedo MR, et al. FGF21 regulates metabolism through adipose-dependent and -independent mechanisms. *Cell Metab* [Internet]. Elsevier Inc.; 2017;25(4):935–944.e4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2017.03.005>
23. Shi C, Huang F, Gu X, Zhang M, Wen J, Wang X, et al. Adipogenic miRNA and meta-signature miRNAs involved in human adipocyte differentiation and obesity. *Oncotarget*. 2016;7(26).
24. Lavery CA, Kurowska-stolarska M, Holmes WM, Donnelly I, Caslake M, Collier A, et al. miR-34a 2 / 2 Mice are Susceptible to Diet-Induced Obesity. 2016;24(8):1741–51. Available from: doi:10.1002/oby.21561
25. Baselga-Escudero L, Pascual-Serrano A, Ribas-Latre A, Casanova E, Salvadó MJ, Arola L, et al. Long-term supplementation with a low dose of proanthocyanidins normalized liver miR-33a and miR-122 levels in high-fat diet-induced obese rats. *Nutr Res* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;35(4):337–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2015.02.008>
26. Yang Z, Cappello T, Wang L. Emerging role of microRNAs in lipid metabolism. *Acta Pharm Sin B* [Internet]. Elsevier; 2015;5(2):145–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2015.01.002>
27. Kim M-S, Kim J-K, Kim H-J, Moon S-R, Shin B-C, Park K-W, et al. Hibiscus Extract Inhibits the Lipid Droplet Accumulation and Adipogenic Transcription Factors Expression of 3T3-L1 Preadipocytes. *J Altern Complement Med* [Internet]. 2003;9(4):499–504. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/107555303322284785>
28. Hausman GJ, Basu U, Wei S, Hausman DB, Dodson MV. Preadipocyte and

- adipose tissue differentiation in meat animals: Influence of species and anatomical location. *Annu Rev Anim Biosci* [Internet]. 2014;2(1):323–51. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-animal-022513-114211>
29. Agrawal A, Parlee S, Perez-Tilve D, Li P, Pan J, Mroz PA, et al. Molecular elements in FGF19 and FGF21 defining KLB/FGFR activity and specificity. *Mol Metab* [Internet]. Elsevier GmbH; 2018;13:45–55. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.05.003>
  30. Zeng K, Tian L, Patel R, Shao W, Song Z, Liu L, et al. Diet polyphenol curcumin stimulates hepatic Fgf21 production and restores its sensitivity in high-fat-diet-fed male mice. *Endocrinology*. 2017;158(2):277–92.
  31. Gamboa-gómez CI, Rocha-guzmán NE, Gallegos-infante JA, Moreno-jiménez MR, Vázquez-cabral BD, González-laredo RF, et al. Plants with potential use on obesity and its complications. *EXCLI J* [Internet]. 2015;809–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.17179/excli2015-186%0AThis>
  32. Fisher FM, Chui PC, Antonellis PJ, Bina HA, Kharitonov A, Flier JS, et al. Obesity is a fibroblast growth factor 21 (FGF21)-resistant state. *Diabetes* [Internet]. 2010;59(11):2781–9. Available from: doi: 10.2337/db10-0193
  33. Lo KA, Sun L. Turning WAT into BAT: A review on regulators controlling the browning of white adipocytes bioscience reports. 2013;711–20. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23895241>
  34. Xie Q, Tian T, Chen Z, Deng S, Sun K, Xie J, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in regenerative medicine: Molecular mechanism for PPAR in stem cells' adipocyte differentiation [Internet]. Vol. 11, *Current Stem Cell Research and Therapy*. 2016. p. 290–8. Available from: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84961752906&partnerID=40&md5=9cb73922d539b2c42898887ff8b6f5e2>
  35. Tian C, Ye X, Zhang R, Long J, Ren W, Ding S, et al. Green Tea polyphenols reduced fat deposits in high fat-fed rats via erk1/2-ppary-adiponectin pathway. *PLoS One* [Internet]. 2013;8(1). Available from: doi: 10.1371/journal.pone

## RIWAYAT HIDUP



Nama Lengkap : Heriyanto  
NPM : 1606839776  
Alamat : Perumahan Villa Serpong Blok D6 No.17 RT.064  
RW.010 Kelurahan Jelupang, Kecamatan Serpong  
Utara, Kota Tangerang Selatan Provinsi Banten  
Umur / Kelamin / Agama : 30 tahun / Laki laki / Budha  
Tempat dan tanggal lahir : Prabumulih, 15 Juli 1989  
Asal Instansi : UKRIDA  
Alamat Instansi : Jl. Arjuna Utara No.6  
Riwayat Pendidikan :  
SD : SD Santa Maria Prabumulih Lulus Tahun 2000  
SMP : SMP Santa Maria Prabumulih Lulus Tahun 2003  
SMA : SMA Negeri 1 Prabumulih Lulus Tahun 2006  
S1 : Dokter Umum Lulus Tahun 2012  
Pengalaman Penelitian : tidak ada  
Publikasi :  
Tinjauan Pustaka pada Jurnal Kedokteran Meditek vol. 14 no. 37 Mei-Agustus  
2006 dengan judul:  
“Berbagai Usaha dalam Mengatasi Penyebaran Virus Flu Burung”  
Biaya penelitian berasal dari : Hibah PDUPT tahun 2018

## **DANA PENELITIAN**

Dana penelitian ini berasal dari Hibah PDUPT tahun 2018 dengan jumlah sebesar Rp. 136.588.000.