

The Effect of *Moringa Oleifera* Leaf Extract in Inhibition of NF κ B Activation, TNF- α and ICAM-1 Expression in Oxidized LDL treated HUVECS

Titin Andri Wihastuti¹, Djanggan Sargowo², M. Saifur Rohman²

Background. Atherosclerosis is a chronic inflammation process of vascular endothelial cells. Increased *oxidized LDL* (OxLDL) is one of the most potent inducer of atherogenesis. OxLDL induces an increased ROS (*Reactive Oxygen Species*) and also acts as cytotoxic and chemotaxis factor for monocytes result in accumulation of inflammatory cells. *Nuclear Factor Kappa Beta* (NF κ B) is a transcription factor that plays an important role in this inflammatory process. NF κ B compose of heterodimer molecules of p50 and p65, which bind to its inhibitor, I κ B, leading to its inactive form in cytoplasm. OxLDL activates NF κ B complex by phosphorylate I κ B resulting in released p50-p65-I κ B binding and translocation of p50-p65 into the nucleus. p50-p65 then binds to promoter and activates transcription of target genes. NF κ B activation therefore increase gene and protein expressions of target molecules such TNF- α , ICAM-1, VICAM, etc. This study aimed to examine whether *Moringa oleifera* inhibits activation of NF κ B dan expression of cytokine TNF- α and adhesion molecule ICAM-1.

Methods and results. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) treated with OxLDL were used as model of atherosclerosis. The increased NF κ B activity was measured by indirect method using p50 subcellular localization by immunohistochemistry. 40 μ g/mL OxLDL, 0.01 gr/mL and 0.005 gr/mL *Moringa oleifera* were used based on preliminary study.

Conclusions. This study showed that OxLDL significantly induce NF κ B activation and increase protein expression of TNF- α and (ICAM-1). This study also observed that *Moringa oleifera* significantly inhibit NF κ B activation, and prevent an increased TNF- α and ICAM-1 expression at protein level in OxLDL-treated HUVECs as compare to the controls. *Moringa oleifera* dose of 0.01mg/mL has a better inhibition effect as compare to that of 0.005 gr/mL.

(J Kardiol Ind 2007;28:182-188)

Keywords: *Moringa oleifera* Leaves Extract, Oxidized-LDL, NF κ B, TNF- α , ICAM-1

Alumni Post Graduate Program
Brawijaya University ¹
Post Graduate Program, Medical
Faculty, Brawijaya Universitas,
Malang ²

Efek Ekstrak Daun Kelor (*Moringa Oleifera*) Dalam Menghambat Aktifasi NFκB, Ekspresi TNF-α dan ICAM-1 pada HUVECS yang Dipapar LDL Teroksidasi

Titin Andri Wihastuti¹, Djangan Sargowo², M. Saifur Rohman²

Latar Belakang. Aterosklerosis merupakan peradangan kronis pada sel endotel pembuluh darah. Peningkatan LDL teroksidasi (OxLDL) merupakan salah satu perangsang utama terjadinya aterogenesis. OxLDL menginduksi kenaikan ROS (*Reactive Oxygen Species*), juga bersifat sitotoksik dan kemotaksis bagi monosit, sehingga mengakibatkan penumpukan sel-sel radang. *Nuclear Factor Kappa Beta* (NFκB) adalah faktor transkripsi yang mempunyai peran penting terhadap terjadinya peradangan ini. NFκB terdiri dari heterodimer p50 dan p65 yang berikatan dengan inhibitor Kappa B (IκB), sehingga dalam sitoplasma berbentuk inaktif. Dengan cara memfosforilasi IκB, maka OxLDL kompleks NFκB melepas ikatan p50-p65-IκB. Selanjutnya p50-p65 berpindah ke inti sel, dan melekat pada promotor (urutan DNA yang penting untuk memicu terjadinya transkripsi) mengaktifasi proses transkripsi dari gen-gen target. Oleh karena itu, peningkatan aktivitas NFκB akan meningkatkan ekspresi gen dan protein-protein yang menjadi target NFκB antara lain TNF-α, ICAM-1 dan VICAM. Penelitian ini bertujuan untuk menguji apakah daun kelor (*Moringa Oleifera*) dapat menghambat aktifasi NFκB, sehingga pembentukan sitokin TNF-α dan molekul adesi ICAM-1 terhambat.

Metode dan hasil. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) yang dipapar dengan OxLDL dipakai sebagai model yang menyerupai aterosklerosis. Peningkatan aktifitas NFκB diukur secara tidak langsung dengan cara mendeteksi jumlah p50 menggunakan metoda imunohistokimia. Dosis 40 ug/mL OxLDL serta 0.01 gr/mL dan 0.005 gr/mL ekstrak daun kelor dipakai berdasarkan hasil studi pendahuluan.

Kesimpulan. Pemberian OxLDL pada HUVECs meningkatkan aktifitas NFκB dan ekspresi TNF-α dan ICAM-1 secara bermakna. Dari penelitian ini juga dibuktikan bahwa, ekstrak daun kelor dapat menghambat aktivasi NFκB dan menurunkan ekspresi TNF-α dan ICAM-1, yang diinduksi oleh OxLDL dibandingkan kontrol (tanpa pemberian daun kelor, p<0,01). Dosis ekstrak daun kelor 0.01mg/mL mempunyai efek penghambatan terhadap aktifasi NFκB, penurunan ekspresi TNF-α dan ICAM-1, yang lebih baik dibandingkan dengan dosis 0.005 gr/mL.

Kata Kunci: Ekstrak Daun Kelor, LDL teroksidasi, NFκB, TNF-α, ICAM-1

Alamat korespondensi:

Titin Andri Wihastuti
Alumni Program Pascasarjana Universitas Brawijaya, Malang¹
Dosen Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang²

Indonesia sebagai negara tropis mempunyai keragaman flora yang berpotensi besar untuk dikembangkan dalam dunia pengobatan. Namun penelitian tentang hal tersebut masih sangat sedikit. Salah satu jenis tumbuhan yang diduga banyak manfaatnya adalah kelor (*Moringa oleifera*).^{1,2}

Daun kelor mengandung banyak kandungan zat seperti: protein, lemak, karbohidrat, berbagai mineral, vitamin dan asam amino. Oleh karena itu, daun kelor dapat dimanfaatkan sebagai makanan alternatif pada kasus malnutrisi. Penduduk Indonesia terutama di pedesaan, juga sering menggunakan daun kelor sebagai obat tradisional. Di India jus daun kelor digunakan untuk menstabilkan tekanan darah dan ansietas. Di Senegal infus daun kelor dipercaya dapat mengontrol kadar glukosa pada penderita Diabetes Mellitus. Di tempat lain daun kelor digunakan juga sebagai obat menurunkan kolesterol, diare, disentri, colitis, gonorrhea, sakit kepala, anemia, iritasi, infeksi, antialergi, antikarsinogenik, antihelminthes dan anti inflamasi.³⁻⁵

Dari beberapa khasiat yang telah ditemukan, tampaknya daun kelor mempunyai peran penting dalam proses inflamasi. Oleh karena itu tidak menutup kemungkinan bahwa daun kelor berperan pula pada proses inflamasi kronis seperti aterosklerosis. Pembentukan aterosklerosis (atherogenesis) dimulai dari penumpukan lekosit terutama monosit dan T lymphosit pada dinding pembuluh darah yang dipicu oleh modifikasi LDL. Salah satu macam modifikasi yang poten sebagai penyebab aterosklerosis adalah *oxidized* LDL. OxLDL juga bersifat sitotoksik dan berfungsi sebagai kemotaksis faktor bagi monosit yang mengakibatkan penumpukan sel-sel radang.^{6,7} Keradangan terjadi karena OxLDL mengaktifkan faktor transkripsi Nuclear Factor Kappa Beta (NF- κ b). NF- κ b merupakan faktor transkripsi yang berperan penting dalam menginduksi regulasi berbagai macam gen dalam respon inflamasi dan proliferasi sel. NF- κ b yang teraktifasi akan menginduksi terbentuknya protein sistem imun dan molekul/zat perantara seperti adesi molekul (ICAM-1, VCAM-1), sitokin (TNF α , IL-1), substans vasoactive (eNOS, NO) dan faktor koagulasi (PAI-1) melalui transkripsi gen.^{8,9} Mengingat keradangan menjadi faktor utama dari patogenesis aterosklerosis maka pencegahan dan pengobatannya dapat di mulai dengan penghambatan aktifasi protein penting yang menimbulkan proses keradangan, yaitu NF- κ b sebagai targetnya.

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan hipotesa bahwa ekstrak daun kelor dapat menghambat aktifasi NF- κ b, dan peningkatan protein yang pembentukannya dirangsang oleh NF- κ b yaitu ICAM-1 dan TNF α . Pada penelitian ini kami menggunakan kultur sel endotel, HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial cells), yang dipapar dengan OxLDL agar dapat menyerupai sel endotel pada penderita penyakit aterosklerosis.

Metoda Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Sentral Biomedik dan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang. periode penelitian pada bulan Januari sampai dengan April 2005.

Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan untuk isolasi HUVECs menurut Jones (1996) adalah sebagai berikut: media untuk pengambilan umbilikus yaitu, *Hank's Balance Salt Solution* (HBSS), *Gentamycine sulphate* (Sigma), *Sodium hydrogen bicarbonate* (Sigma), *Phenol red* (Sigma), *HEPES (10 N-2-Hydroxyethyl-piperazine-N²-ethanesulfonic acid) solution*, *Deionized water*. Bahan isolasi sel endotel: *Kolagenase (Sigma tipe IIA)*. Media Kultur: Serum Free yang mengandung Medium 199 (Gibco), Penisilin (~ 100 m/ml), Streptomisin (~ 100 m /ml) (Sigma), Larutan natrium bicarbonat - phenol red (21 mM/ml), Glutamine (2mM/ml); Media yang mengandung: Serum free medium, Fetal serum (20%), *New Born Serum* (NBS). Bahan untuk perlakuan kultur HUVECs: Ox-LDL *culture great* dari sigma, Daun kelor diperoleh dari Kabupaten Purworejo Jawa Tengah, Bahan untuk perlakuan ox-LDL adalah ox-LDL dari sigma. Bahan untuk ekstraksi daun kelor: Daun kelor yang dikeringkan dengan diangin-anginkan, Alkฮอล์ 70%, Etanol 80%. Bahan untuk pengukuran aktifasi NF- κ β , ekspresi TNF α dan ICAM-1: Hepes buffer, Metanol, PBS pH 7,4, H₂O₂ 3%, Serum FBS 5% yang mengandung 0,25% Triton X-100, Antibody monoclonal anti p50/p65, anti TNF α dan anti ICAM-1, Antibody primer berlabel biotin, Strep Avidin Horse Radish Peroksidase (SA-HRP), Cromogen HRP (DAB/Diamono benzidine), H₂O.

Prosedur Penelitian

Penelitian dibagi menjadi 2 (dua) tahap yaitu :

1. Penelitian eksplorasi

Bertujuan untuk menetapkan dosis ekstrak daun kelor dan dosis *Ox-LDL* yang tepat sehingga dapat mengaktifasi NF- κ b. Dosis *Ox-LDL* yang digunakan adalah 40 mg/ml dan 50 mg/ml. Pada tahap ini dosis ekstrak daun kelor yang diberikan adalah 0,1 gr/ml (dosis 3), 0,05 gr/ml (dosis 2) dan 0,025 gr/ml (dosis 1).

2. Penelitian eksperimen.

Bertujuan untuk melihat efek pemberian ekstrak daun kelor terhadap aktivasi NF- κ b.

Pembagian kelompok dan perlakuan sampel percobaan adalah sebagai berikut:

- a. Kelompok HUVECs tanpa paparan *Ox-LDL* sebagai kontrol negatif.
- b. Kelompok HUVECs dengan paparan *Ox-LDL* sebagai kontrol positif.
- c. Kelompok HUVECs dengan ekstrak daun kelor dosis 1 lalu di papar *Ox-LDL*.
- d. Kelompok HUVECs dengan ekstrak daun kelor dosis 2 lalu di papar *Ox-LDL*.

Berdasarkan penelitian terdahulu, pemberian ekstrak daun kelor dengan diberikan terlebih dahulu selama 2 jam agar bereaksi dengan sel. Selanjutnya dipapar *Ox-LDL* selama 30 menit untuk melihat aktivasi NF- κ b secara tidak langsung dengan adanya perpindahan p50-p65 (dimmer NF- κ b) dari sitoplasma ke inti sel dan selanjutnya 24 jam untuk melihat ekspresi protein TNF- α dan ICAM-1. Deteksi perpindahan p50 dan protein TNF- α dan ICAM-1 dilakukan dengan cara imunohistokimia dan diamati dengan mikroskop Olympus cx21 perbesaran 1000x.

Analisis Data Penelitian

Guna mengetahui adanya efek ekstrak daun kelor pada masing-masing kelompok perlakuan, dihitung jumlah (rata-rata dari lima lapangan pandang mikroskop) NF- κ b yang terdapat pada sitoplasma maupun inti sel, ekspresi protein TNF α , dan ICAM-1 yang kemudian dianalisis menggunakan statistik *one way analysis of varians* (*One Way ANOVA*).

Hasil dan Pembahasan

Hasil penelitian eksplorasi dosis *OxLDL* menunjukkan bahwa, pemberian *OxLDL* 50ug/mL menyebabkan sebagian sel mati sedangkan pada dosis 40 ug/mL sel tampak masih sehat sesuai dengan morfologi sel endotel. Pada pemberian ekstrak daun kelor didapatkan bahwa, pada dosis 0.1 gr/ml semua sel mati, sedangkan pada dosis 0.05 gr/ml hanya sebagian sel yang mati, ditunjukkan dengan morfologi sel yang mengalami pengerutan (*shrinkage*), sedangkan dengan pemberian ekstrak daun kelor dosis 0.025 g/mL

tampak sebagian masih normal dan sebagian sel mengalami kematian.

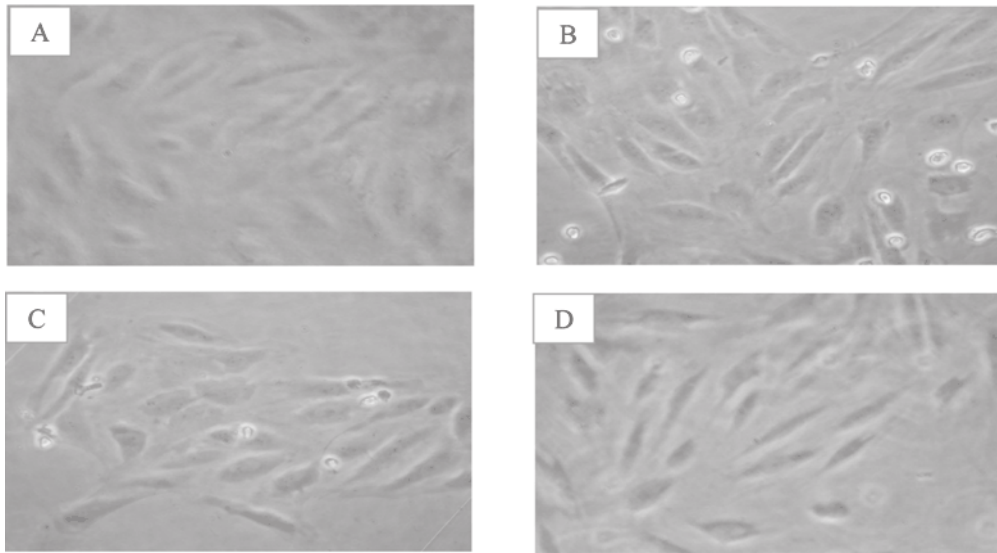
Berdasarkan fenomena di atas maka pada tahap perlakuan berikutnya, dosis ekstrak daun kelor diturunkan menjadi 0,005 gr/ml (dosis 1) dan 0,01 gr/ml (dosis 2), sedangkan dosis *OxLDL* yang digunakan adalah 40 μ g/ml. Dengan dosis tersebut tampak bahwa sel endotel masih terlihat normal seperti terlihat pada **Gambar 1**. Makna temuan ini adalah, sel HUVECs bisa bertahan hidup dengan pemberian ekstrak daun kelor 0.005 g (5 mg/mL) atau 10 mg/mL, dengan dosis *OxLDL* sebesar 40 ug/mL. Dengan dosis tersebut selanjutnya percobaan dilanjutkan untuk melihat aktifitas NF- κ b secara tidak langsung, yaitu dengan mendeteksi jumlah p50, sebagai bagian dari komponen NF- κ b.⁹ Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa, pemberian *OxLDL* pada sel HUVECs mengakibatkan perpindahan p50 dari sitoplasma ke inti sel. Hal ini berbeda secara signifikan bila dibandingkan dengan HUVECs kontrol negatif (tanpa pemberian *OxLDL*), yang tampak sebagian besar p50 masih di sitoplasma. Dalam percobaan ini telah dilakukan fase pembuktian bahwa *OxLDL* dapat menyebabkan p50 yang berada di sitoplasma (tidak aktif) berpindah ke inti sel (aktif). Selanjutnya akan diteliti apakah aktivasi NF- κ b oleh *OxLDL* dapat dihambat oleh daun kelor.

Hambatan Aktivasi NF κ B oleh Antioksidan Ekstrak Daun Kelor

Pengamatan lokalisasi NF- κ b (p50 dengan imunohistokimia dilakukan dengan pembesaran mikroskop 1000x. Pada HUVECs control positif (HUVECs: *OxLDL*) menunjukkan bahwa sebageian besar p50 terdapat di inti sel (aktif). Berbeda bermakna dengan control negative (HUVECs tanpa *OxLDL*). Dengan pemberian ektstrak daun kelor, terdapat penurunan jumlah p50 di inti sel, sebaliknya banyak didapatkan di sitoplasma. Data ini menunjukkan bahwa daun kelor dapat menghambat perpindahan p50 (aktivasi NF- κ b). Jumlah p50 yang terdapat di sitoplasma (tidak aktif) terlihat paling banyak apabila diberikan ekstrak daun kelor 0.01 gr/mL. Sedangkan yang terdapat di inti (aktif) rata-rata sejumlah 10,7%. Disimpulkan bahwa, dosis optimal penekanan aktivitas NF- κ b dicapai pada dosis 0.01 gr/ml). (**Gambar 2**)

Ekspresi Protein TNF α dan ICAM-I

Aktivasi NF- κ b oleh karena *OxLDL* terbukti meningkatkan transkripsi gen, terutama gen-gen yang terlibat dalam respon imun dan peradangan serta molekul seperti



Gambar 1. Kultur Sel Endotel 2 jam setelah pemaparan ekstrak daun kelor dan LDL teroksidasi

Keterangan :

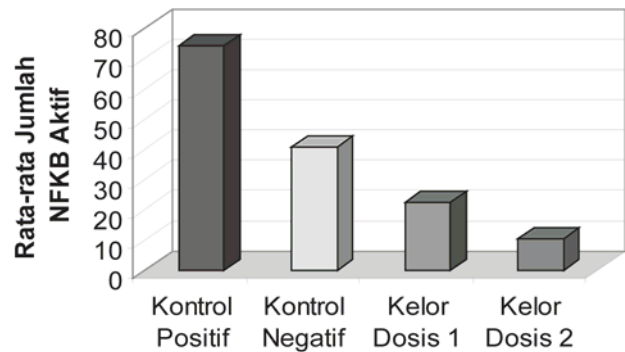
- A. Kontrol + (HUVECs + LDL teroksidasi)
 - B. Kontrol - (HUVECs)
 - C. Dosis 1 ekstrak daun kelor (0,005 gr/ml) + LDL teroksidasi
 - D. Dosis 2 ekstrak daun kelor (0,01 gr/ml) + LDL teroksidasi
- Sebagian besar sel pada tiap-tiap kelompok dalam kondisi hidup dan konfluen, sehingga dapat dilanjutkan pada tahap perlakuan berikutnya.

ekspresi TNF α dan ICAM-1. Berdasarkan ANOVA didapatkan hasil bahwa, antara kelompok sel endotel pada HUVECs yang dipapar OxLDL dan yang tidak dipapar OxLDL terdapat perbedaan 8,67% ekspresi TNF α (BNT = 3,99% , $\alpha=5\%$).

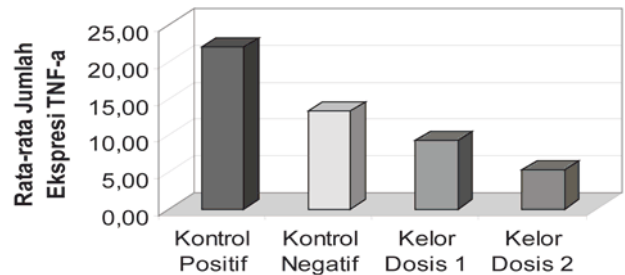
Berdasarkan perhitungan statistik didapatkan bukti yang sangat kuat ($F_{test}, 3 ; df, 8 ; p < 0,01$) bahwa ekstrak daun kelor dapat menghambat ekspresi TNF- α pada HUVECs yang dipapar OxLDL. Rerata TNF- α yang terekspresi paling sedikit sejumlah 5,33% didapatkan pada ekstrak daun kelor dengan dosis 2 (0,01gr/ml). (**Gambar 3**)

Dengan analisis statistik ANOVA didapatkan hasil bahwa, antara kelompok sel endotel pada HUVECs yang dipapar OxLDL dan yang tidak dipapar OxLDL terdapat perbedaan 34,0% ekspresi ICAM-1 (BNT = 8,26%; $\alpha=5\%$). Hal tersebut membuktikan bahwa paparan OxLDL meningkatkan ekspresi ICAM-1 melalui mekanisme induksi cytokine (TNF α) ataupun melalui regulasi transkripsi dari NF- κ b yang teraktivasi oleh terbentuknya ROS.

Dengan Analisis statistik ANOVA didapatkan hasil bahwa antara kelompok sel endotel pada HUVECs yang dipapar OxLDL dan yang tidak dipapar OxLDL terdapat perbedaan 34,0% ekspresi ICAM-1 (BNT =



Gambar 2. Rata-rata Jumlah NF-kb yang Aktif pada Kelompok Perlakuan



Gambar 3. Jumlah Ekspresi TNF α rerata pada berbagai perlakuan

8,26%; $\alpha=5\%$). Hasil ini membuktikan bahwa, paparan OxLDL meningkatkan ekspresi ICAM-1 melalui mekanisme induksi cytokine (TNF α) ataupun melalui regulasi transkripsi dari NF- κ b yang teraktivasi akibat dari terbentuknya ROS.

Berdasarkan perhitungan statistik didapatkan bukti yang sangat kuat (F test, 3 ; df,8 ; $p<0,01$) bahwa, ekstrak daun kelor dapat menghambat ekspresi ICAM-1 pada HUVECs yang dipapar OxLDL. ICAM-1 rerata yang terekspresi paling sedikit, yaitu sejumlah 22,3% didapatkan pada ekstrak daun kelor dengan dosis 2 (0,01gr/ml). (**Gambar 4**)

Dari hasil penelitian diatas terlihat bahwa pemberian ekstrak daun kelor menurunkan aktifitas NF- κ b dan ekspresi protein TNF α dan ICAM-1 secara simultan. Semakin rendah aktifitas NF- κ b semakin rendah ekspresi protein TNF α dan ICAM-1 (**Gambar 5**). Pada dosis 0.01 gr/mL secara bermakna tidak hanya menurunkan aktifitas NF- κ b tetapi juga menurunkan ekspresi TNF α dan ICAM-1 lebih efektif dibandingkan dosis 0.005 gr/mL.

DISKUSI

Pada penelitian ini telah dibuktikan bahwa daun kelor dapat menghambat aktivasi NF- κ b dan menurunkan ekspresi protein TNF α dan ICAM-1. Daun kelor mengandung dua jenis zat bioaktif yaitu quercetin dan kaempferol.¹⁰

Kedua jenis zat bioaktif tersebut termasuk dalam bioflavonoid. Flavonoid mempunyai kecenderungan mengikat atom, atau sebagai "scavenging" bagi radikal bebas, sehingga tidak terbentuk ROS berlebihan. Pada percobaan ini ROS terbentuk akibat pemberian OxLDL. ROS ini dapat merangsang proses fosforilasi dari Inhibitor KB (IKB). IKB berfungsi untuk

mengikat NF- κ b sehingga tetap tidak aktif di sitoplasma. Apabila IKB terfosforilasi maka ikatan NF- κ b dan IKB terlepas, sehingga NF- κ b menjadi aktif dan berpindah ke inti. Proses ini disebut proses aktivasi NF- κ b.¹¹ Apabila pembentukan ROS dihambat oleh zat aktif daun kelor, maka aktivasi NF- κ b pun dapat dihambat. Disamping itu, telah dibuktikan pada penelitian-penelitian sebelumnya bahwa *Quercetin* dan *kaempferol* bersifat kompetitif dalam memperoleh ATP, padahal ATP juga dibutuhkan dalam aktifitas protein kinase pada proses fosforilasi IKB.¹⁰

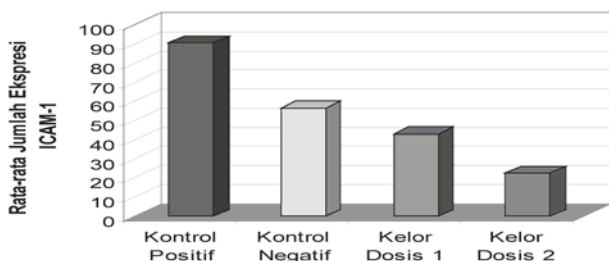
Adanya kerusakan sel endotel yang ditimbulkan oleh ROS sebagai hasil dari paparan LDL teroksidasi, akan meningkatkan perlekatan leukosit, terbentuknya sitokine dan akan terjadi respon inflamasi. Terbentuknya sitokine TNF α akan membantu perlekatan leukosit dengan cara meningkatkan ekspresi ICAM-1. TNF α merupakan mediator penting dalam proses inflamasi, berperan dalam meningkatkan respon inflamasi sel endotel. Aksi TNF α dalam sel endotel umumnya adalah mensintesa protein baru, yang akan menginisiasi transkripsi gen. TNF α juga menginduksi fosforilasi inhibitor-KB (IKB), sehingga degradasi protein IKB menyebabkan NF κ B lepas menuju nukleus. Dalam nukleus NF- κ b akan mengaktifkan transkripsi melalui ikatan dengan DNA sequence pada target gen, diantaranya adalah ICAM-1 dan TNF α juga.^{11,12} Pada penelitian ini terbukti daun kelor dapat menurunkan ekspresi protein TNF α , sehingga NF- κ b yang aktif juga berkurang dan ICAM-1 juga menurun ekspresinya.

Kesimpulan

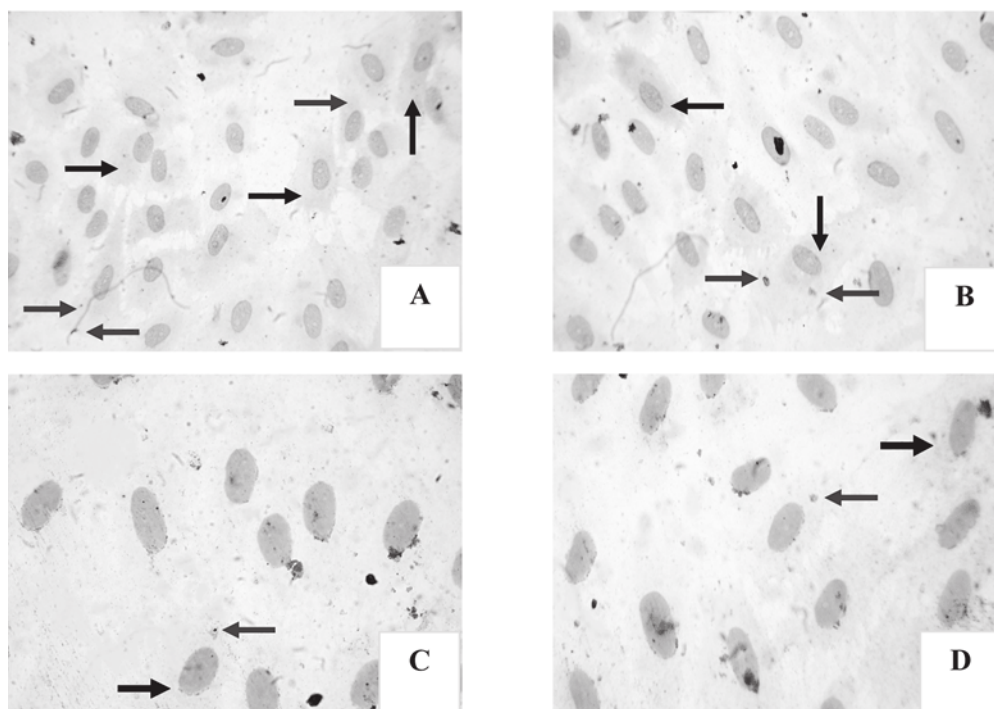
Dari penelitian ini didapatkan bukti yang sangat kuat bahwa pada HUVECs yang dipapar LDL teroksidasi ternyata ekstrak daun kelor dapat menghambat aktivasi NF- κ b, dan juga dapat menghambat ekspresi TNF- α dan ICAM-1.

Saran

Sebaiknya dibuat penelitian serupa yang menggunakan binatang coba (in vivo), dan juga penelitian yang menggunakan ekstrak daun kelor dengan rentang dosis antara 0,005-0,01 gr/ml menggunakan metoda langsung, untuk mendeteksi ikatan NF- β dengan gen target secara EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)



Gambar 4. Rerata Jumlah Ekspresi ICAM-1 pada Berbagai Perlakuan



Gambar 5. Hasil Immunohistokimia TNF α dan ICAM (double staining) pada Kontrol +, Kontrol -, Kelor Dosis 1, Kelor Dosis 2

Keterangan :

- A. Hasil imunohistokimia TNF α dan ICAM-1 pada kontrol + (HUVECs + LDL teroksidasi) : sebagian besar inti sel terlihat diselubungi warna coklat (panah hitam). Hal tersebut menunjukkan ekspresi ICAM-1 (panah hitam) pada membran sel yang tampak secara 3 dimensi. Warna merah dalam sitoplasma yang menunjukkan ekspresi TNF α sedikit terlihat (panah biru) .
- B. Hasil Immunohistokimia TNF α dan ICAM-1 pada kontrol - (HUVECs normal) : Sebagian besar sel tidak menunjukkan ekspresi TNF α (panah biru) dan ICAM-1 (panah hitam).
- C. Hasil Immunohistokimia TNF α (panah biru) dan ICAM-1 (panah hitam) pada HUVECs yang diberikan ekstrak daun kelor dosis 1 (0,005 gr/ml) dan dipapar LDL teroksidasi.
- D. Hasil Immunohistokimia TNF α (panah biru) dan ICAM-1 (panah hitam) pada HUVECs yang diberikan ekstrak daun kelor dosis 2 (0,01 gr/ml) dan dipapar LDL teroksidasi.

Daftar Pustaka

1. Makkar , Becker K. 1997. *Nutrients and Antiquality Factors in Different Morffhological Parts of The Moringa Oleifera Tree*, J Agric Sci, Cambridge. 128: 311-322
2. Caceres, A. Saravia, A. et.al, 1992. *Pharmacologic Properties of Moringa Oleifera.2: Screening for Antispasmodik, antiinflamatory and Diuretic Activity*, J Ethnopharmacol. 36:233-237
3. Faizi S. Siddiqui BS. Saleem R. 1995. *Fully Acetylated Carbamate and Hypotensive Thiocarbonated Glycosidea from Moringa Oleifera*. J. Phytochemistry. 38:957-963
4. Karr A, Choudhary BK. Bandyopadhyay NG. 2003. *Comparative Evaluation of Hypoglycaemic Activity of Some Indian Medicinal Plants in Allxan Diabetics Rats*. J. Ethnopharmacol 84:105-108
5. Guevara AP, Vargas C, Sakurai H, et.al. 1999. *An Antitumor Promoter from Moringa Oleifera Lam*. Mutat Res. 440:181-188
6. Glasser SP, Selwyn MD, Ganz P. 1996. *Atherosclerosis: Risk Factors and The Vascular Endothelium*. Am Heart J. 131:379-384.
7. Collins, Tucker, Cybulsky, Myron I. 2001. *NF-kB : Pivotal Mediator Or Innocent Bystander In Atherogenesis ?* Journal of Clinical Investigation. 107: 255-263
8. Brand, K. 1996. *Activated Transcription Factor Nuclear Factor Kappa Beta Is Present In Atherosclerotic Lesion*. Journal of Clinical Investigation. 97: 1715-1722

9. Epstein, Franklin H. 1997. *Nuclear Factor Kappa Beta- A Pivotal Transcription Factor in Chronic Inflammatory Disease*. New Eng J Med. 15: 1066-1071.
10. Nakagawa, K; Kawagoe M. 2000. *Differential Effects of Flavonoid Quercetin on Oxidative Damages Induced by Hydrophilic and Lipophilic Radical Generators in Hepatic Lysosomal Fractions of Mice*. Journal of Health Science. 46: 509-512
11. Tak, P. Firestein, S. 2001. *NF- κ B : A Key Role In Inflammatory Diseases*. The Journal of Clinical Investigation, Volume 107, No.1, p.7-10.
12. Ross, Russell. 1999. *Atherosclerosis-An Inflammatory Disease*. N. Eng J Med. 340: 115-126.