

**PENGARUH PEMBERIAN SEDIAAN NANOPARTIKEL KITOSAN EKSTRAK
ETANOL ROSELA (*Hibiscus sabdariffa L.*) PADA TIKUS
HIPERKOLESTEROL TERHADAP PROFIL LIPID.**

Meta Safitri, Nurkhasanah, Laela Hayu Nurani

Program Pascasarjana Farmasi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta
Email : metasafitri@yahoo.co.id

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian Sediaan Nanopartikel Kitosan Ekstrak Etanol Rosela (SNKEER) terhadap profil lipid tikus galur Sprague Dawley yang diinduksi hiperkolesterol. Pembuatan SNKEER dilakukan berdasarkan hasil optimasi dengan perbandingan 2:1:1/10 (ekstrak etanol rosela (EER) : kitosan : TPP), selanjutnya dilakukan uji in vivo dengan menggunakan Tikus putih betina galur Sprague Dawley (SD) umur 6-8 minggu sejumlah 25 ekor dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu kelompok I (K1) adalah kelompok kontrol diberi pakan standar; kelompok II (K2) diinduksi hiperkolesterol; serta kelompok III (3), IV (4), dan V (5) diinduksi hiperkolesterol dan SNKEER masing-masing dengan dosis 25, 50, dan 100 mg/kgBB, selama 30 hari. Pada hari ke 31 semua hewan uji diambil darahnya melalui vena orbitalis mata untuk dilakukan pengukuran profil lipid (Kolesterol Total, kadar LDL, HDL, Trigliserida). Analisis yang dilakukan terhadap penelitian ini adalah One Way Analisis Of Variance (ANOVA) dengan uji lanjutan Tukey 5 %. Hasil penelitian rata-rata pengukuran profil lipid adalah sebagai berikut : pada pengukuran Kolesterol K1, K2, K3, K4, K5 berturut-turut yaitu 106,76; 233,45; 197,63; 158,61; 133,94 mg/dl, Trigliserida : 73,33; 125,51; 107,97; 90,43; 80,87 mg/dl, HDL: 44,41; 14,45; 18,19; 23,68; 30,90mg/dl, LDL: 51,58; 72,24; 63,16; 54,61; 51,84 mg/dl. Hasil dari analisis data menunjukkan bahwa kelompok SNKEER dosis (25, 50, 100 mg/kgBB) dapat berpengaruh signifikan terhadap perbaikan profil lipid terutama dalam menurunkan kadar kolesterol total, trigliserida, dan kadar LDL serta dapat meningkatkan kadar HDL secara signifikan bila dibandingkan dengan kelompok hiperkolesterol (K2). Adapun kelompok perlakuan yang memberikan hasil perbaikan profil lipid terbaik adalah kelompok SNKEER dosis 100 mg/kgBB bila dibandingkan dengan semua kelompok perlakuan ($P < 0,05$).

Kata kunci : Rosela, Nanopartikel, Hiperkolesterol, Profil lipid

ABSTRACT

The purpose of this study was to determine the effect of chitosan nanoparticles preparation Ethanol Extract Roselle (SNKEER) on the lipid profile of Sprague Dawley rat strain-induced hypercholesterolemia. Making SNKEER done based on the results of the optimization with a ratio of 2: 1: 1/10 (ethanol extract of roselle (EER): chitosan: TPP), further in vivo tests using female white rat strain Sprague Dawley (SD) age of 6-8 weeks a number of 25 were divided into 5 groups: group I (K1) is the control group were fed a standard; group II (K2) induced hypercholesterolemia; and group III (3), IV (4), and V (5) induced hypercholesterolemia and SNKEER each at a dose of 25, 50, and 100 mg / kg, for 30 days. On day 31, all test animals orbital venous blood drawn through the eye to be measured lipid profile (total cholesterol, LDL cholesterol, HDL, triglycerides). Analysis for this study is followed by Tukey follow-up test 5%. The results of the study the average measurements of lipid profile is the measurement of cholesterol K1, K2, K3, K4, K5 were 106.76; 233.45; 197.63; 158.61; 133.94 mg / dl respectively, Triglycerides: 73.33; 125.51; 107.97; 90.43; 80.87 mg / dl, HDL: 44.41; 14.45; 18.19; 23.68; 30.90mg / dl, LDL: 51.58; 72.24; 63.16; 54.61; 51.84 mg / dl. The results of the data analysis showed that the group SNKEER doses (25, 50, 100 mg / kg body weight) can

significantly have effect on the increasing of the lipid profile, especially in the lower levels of total cholesterol, triglycerides, and LDL levels and HDL levels significantly when compared to hypercholesterolemia (K2). The treatment group that produces the best improvements in lipid profiles was SNKEER group with dose of 100 mg / kg when compared to all treatment groups ($P < 0.05$).

Key words : Roselle, Nanoparticles, hypercholesterolemia, lipid profile

PENDAHULUAN

Pola makan yang banyak mengandung kolesterol, serta gaya hidup yang tidak sehat, stres, merokok disertai intensitas makan yang tinggi, membuat kadar kolesterol darah sangat sulit dikendalikan yang dapat menimbulkan kondisi hiperkolesterol (Mughtar *et al*, 2012).

Hiperkolesterol merupakan suatu keadaan dimana terjadi peningkatan kadar kolesterol dalam darah, peningkatan kadar Low Density Lipoprotein (LDL) dan LDL teroksidasi yang penting dalam proses pembentukan plak arterosklerosis. Arterosklerosis sendiri merupakan penyebab utama dari penyakit jantung koroner (Agoreyo, *et al* 2008).

Penyakit jantung koroner merupakan masalah kesehatan masyarakat yang penting karena morbiditas dan mortalitasnya yang tinggi. Diperkirakan bahwa diseluruh dunia, PJK (Penyakit Jantung Koroner) pada tahun 2020 menjadi pembunuh pertama yakni sebesar 36% dari seluruh kematian, menurut Badan Kesehatan Dunia (WHO), 60% dari seluruh penyebab kematian penyakit jantung adalah penyakit jantung koroner (PJK) (WHO, 2006).

Tanaman sebagai bahan obat telah dimanfaatkan masyarakat Indonesia sejak dahulu, salah satu tanaman yang banyak digunakan sebagai bahan obat saat ini yaitu bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa L.*). Antosianin, flavonoid, dan polifenol merupakan zat kardioprotektif pencegah penyakit kardiovaskuler yang terdapat dalam bunga rosela.

Antosianin yang umumnya menjadi fokus penelitian pada bunga rosela merupakan senyawa pewarna yang paling penting dan paling tersabar luas, antosianin memiliki stabilitas yang rendah dan mudah rusak oleh faktor lingkungan, tidak stabil dalam larutan basa atau netral, dan dalam larutan asam

warnanya dapat memudar perlahan-lahan akibat terkena cahaya (Harbone, 1973). Oleh karena itu diperlukan adanya upaya untuk meningkatkan stabilitas dan penyerapan dari kandungan senyawa yang terkandung dalam bunga rosela, yaitu dengan membuat sediaan nanopartikel, dapat meningkatkan luas permukaan, sehingga dapat meningkatkan jumlah obat yang terabsorpsi, serta dapat meningkatkan aseptabilitas. (Grupta *et al*, 2006)

Nanopartikel merupakan partikel koloid dan padat yang mempunyai ukuran diameter antara 10-1000 nm, diformulasikan menggunakan polimer *biodegradable* maupun non *biodegradable* yang mana bahan obat dapat terjebak, diabsorpsi atau bergandengan secara kimia (Shoo & Labhasetwar, 2006 cit Banne 2011). Nanopartikel menyebabkan ekstrak mudah menyebar dalam darah dan lebih akurat dalam mencapai target (Populain & Nakache 1998).

Kitosan merupakan hasil ekstraksi limbah kulit hewan golongan *Crustacea* (Hu *et al*, 2007). Kitosan bersifat *biodegradable*, biokompatibel, non imunogenik serta non karsinogenik sehingga cocok digunakan dalam teknologi farmasi.

Salah satu upaya yang dapat dikembangkan untuk mengatasi permasalahan tersebut adalah dengan membuat sediaan menjadi bentuk nanopartikel dengan penyalut kitosan, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian nanopartikel kitosan ekstrak etanol rosela terhadap profil lipid tikus hiperkolesterol.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan desain penelitian “*Post Test Control Group Design*”. Hewan coba yang digunakan adalah 25 ekor tikus

betina galur *sprague dawley* yang diperoleh dari UPHP Yogyakarta sebagai obyek penelitian.

Hewan coba dibagi menjadi lima kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol negatif (1) yang hanya diberi pakan standar sebanyak 20g/hari/ekor, kelompok kontrol positif (2) (hiperkolesterol) yang diberikan induksi hiperkolesterol dan pakan standar, serta kelompok terapi yang diberikan induksi hiperkolesterol, pakan standar, dan kemudian diterapi dengan Sediaan Nanopartikel Kitosan Ekstrak Etanol Rosela (SNKEER) dengan dosis 25 mg/kg BB (3), dosis 50 mg/kg BB (4), dan dosis 100 mg/kg BB (5).

Sebelum diberi perlakuan, 25 ekor tikus diadaptasikan terlebih dahulu dengan keadaan laboratorium selama 7 hari dengan pemberian pakan standar. Pakan diberikan sebanyak 20 g per hari, dan air minum secara ad libitum. Sisa pakan ditimbang setiap hari, sebelum diganti dengan pakan yang baru. Berat badan tikus ditimbang setiap minggu. Kandang yang digunakan adalah kandang individu yang dibersihkan setiap hari.

Setelah diadaptasikan selama 7 hari, kemudian kelompok tikus 2, 3,4, dan 5 diinduksi pakan hiperkolesterol selama 30 hari, sedangkan kelompok 3,4, dan 5 mulai diterapi dengan SNKEER dengan dosis 25 mg/kg BB (3), dosis 50 mg/kg BB (4), dan dosis 100 mg/kg BB (5). Pada hari ke-30 tiap kelompok di uji kadar kolesterol, dikatakan hiperkolesterol apabila kadarnya telah > 140 mg/dl (Hirunpanich et al, 2006), maka pada hari ke-31, kelompok 1,2,3,4 dan 5 di nekropsi. Diambil melalui vena orbitalis mata yang kemudian digunakan untuk pemeriksaan kolesterol total, kadar LDL, HDL dan trigliserida menggunakan CHOD-PAP.

Komposisi Pakan Standar. Pakan standar yang diberikan setiap hari adalah sebesar 20 gram yang terdiri dari comfeed PARS (dengan kandungan air 12%, protein 11 %, lemak 4%, serat 7%, abu 8%, Ca 1,1 %, fosfat 0,9%, antibiotik, coccidiostat 53%), dan tepung terigu 23,5%, dan air 23,5%.

Induksi Hiperkolesterol. Setiap tikus diberikan induksi hiperkolesterol dengan

komposisi kolesterol 2% dan asam kolat 1% dari pakan, yang dilarutkan dengan aquades sampai volume 2 ml.

Pembuatan Ekstrak Etanol Rosela. Simplisia dikeringkan dalam oven dengan suhu 40°C selama 7 jam. Sebanyak 1500 gram serbuk simplisia diekstraksi dengan pelarut etanol 60% sebanyak 7,5 liter (1:5) menggunakan metode maserasi dengan pengadukan menggunakan stirrer selama kurang lebih 1 jam, kemudian didiamkan sampai 24 jam sembari sesekali di aduk-aduk. Maserat dipisahkan dan disaring menggunakan kain flannel. Filtrat hasil penyaringan diuapkan dengan *vacum rotary evaporator* dengan suhu 60°C dan kecepatan 100 rpm hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental ditimbang dan dihitung rendemennya (Anonim, 2004).

Pembuatan Sediaan Nanopartikel Kitosan Ekstrak Etanol Kelopak Bunga Rosela (*Hibiscus sabdariffa L.*) (Riski, 2014). Pembuatan dapar asetat PH 4, yaitu dengan menimbang natrium asetat 715,4 mg di larutkan dengan aquades sampai volume 500 ml. Cek PH, jika PH nya belum 4 maka di tambahkan asam asetat sampai PH 4.

Pembuatan larutan kitosan, yaitu dengan menimbang 1 g kitosan dan dilarutkan dengan dapar asetat PH 4 sampai volume 500 ml dan di stirer \pm 20 menit pada suhu 60°C hingga benar-benar terlarut.

Pembuatan larutan ekstrak etanol kelopak bunga rosela, yaitu dengan menimbang 2 gram ekstrak dan di larutkan dalam etanol 70 % sebanyak 500 ml, stirer \pm 20 menit pada suhu 60° hingga benar-benar terlarut, kemudian di saring.

Pembuatan larutan TPP, yaitu dengan menimbang TPP sebanyak 100 mg dan dilarutkan dalam aquades sebanyak 50 ml, stirer \pm 20 menit pada suhu 60° hingga benar-benar terlarut.

Pembuatan sediaan nanopartikel, yaitu dengan mencampur larutan kitosan dan larutan ekstrak sambil di stirer pada suhu 60°C \pm 10 menit, setelah itu tambahkan larutan TPP, stirer pada suhu 60 °c selama 5 menit kemudian ultrasonifikasi pada suhu 30 °c selama 30 menit.

Pemberian Sediaan Nanopartikel Kitosan Ekstrak Etanol Rosela (SNKEER). Pemberian diberikan dengan cara sonde oral dengan dosis pada kelompok 3, 4, dan 5 berturut-turut adalah 25 mg/kgBB/hari, 50 mg/kgBB/hari, dan 100 mg/kgBB/hari selama 30 hari. Dosis terapi yang diberikan di sesuaikan dengan rata-rata berat badan tikus yang di timbang setiap harinya dengan volume pemberian 2 ml/hari.

Pengambilan Serum. Darah mencit diambil melalui vena orbitalis mata dan ditampung dalam apendrof. Darah didiamkan selama 15 menit dan disentrifus selama 20 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Serum diambil dan disimpan dalam pendingin.

Metode pemeriksaan. Metode pemeriksaan kolesterol total, trigliserida, LDL, dan HDL dengan menggunakan CHOD-PAP dengan prinsip spektrofotometri enzimatis.

Analisis data. Data numerik dari pemeriksaan dengan metode CHOD-PAP yang menunjukkan profil lipid dalam darah pada masing-masing kelompok diproses dengan program SPSS versi 16.0. bila hasil analisis ragamnya berbeda nyata (signifikan), maka untuk mengetahui perlakuan mana yang berbeda digunakan uji lanjut *Tukey* $\alpha = 5\%$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan kadar kolesterol total, trigliserida, HDL, dan LDL darah mencit pada penelitian ini dilakukan dengan metode enzimatis menggunakan alat spektrofotometer. Dalam periode induksi hiperkolesterol terjadi peningkatan kolesterol total, trigliserida, kadar LDL dan HDL.

Hasil pemeriksaan Post test rata-rata kadar kolesterol total, trigliserida, LDL, dan HDL hewan coba hiperkolesterol yang diterapi dengan SNKEER ditunjukkan dengan hasil analisis data menggunakan SPSS 16.0, dan didapatkan hasil rata-rata kadar adalah sebagai berikut (Tabel .1)

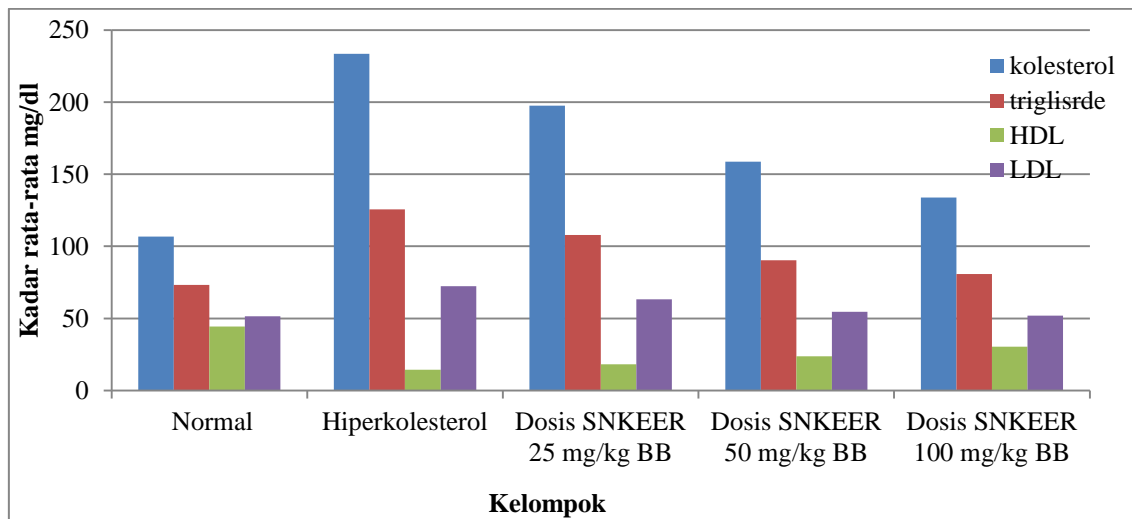
Pada tabel 1 dapat dilihat bahwa kadar kolesterol total, trigliserida, serta kadar LDL tikus hiperkolesterol yang diterapi dengan SNKEER dosis 25mg/kgBB , 50mg/kgBB, dan 100mg/kgBB terjadi penurunan yang signifikan jika dibandingkan dengan tikus hiperkolesterol, sedangkan kadar HDL pada tikus hiperkolesterol yang diterapi dengan SNKEER dosis 25mg/kgBB (18,19±1,856 mg/dl), 50mg/kgBB (23,68±2,0398 mg/dl), dan 100mg/kgBB (30,90±1,2866 mg/dl) terjadi kenaikan yang signifikan jika dibandingkan dengan tikus hiperkolesterol (14,45±3,1939 mg/dl).

Hiperkolesterol merupakan suatu keadaan yang meliputi kenaikan kadar kolesterol total, trigliserida, LDL, dan atau penurunan kadar HDL. Adanya peningkatan LDL dan penurunan HDL pada keadaan hiperkolesterol, disebabkan adanya penimbunan kolesterol dalam darah akibat induksi hiperkolesterol.

Tabel. 1 Rata-rata Kadar Kolesterol Total, Trigliserida, HDL dan LDL.

Kelompok	Mean (mg/dl) ± SD		Mean ± SD	
	Kolesterol Total	Trigliserida	Kadar HDL	Kadar LDL
Normal (K1)	106,76 ± 3,8611	73,33 ± 3,0052	44,41±2,2485	51,58±2,30
Hiperkolesterol (K2)	233,45 ± 4,1520 ^{(a)(b)}	125,51±5,5754 ^{(a)(b)}	14,45±3,1939 ^{(a)(b)}	72,24±4,4958 ^{(a)(b)}
SNKEER 25mg/kgBB (K3)	197,63 ± 5,0875 ^{(a)(b)}	107,97±3,9357 ^{(a)(b)}	18,19±1,856 ^{(a)(b)}	63,16±2,9421 ^{(a)(b)}
SNKEER 50mg/kgBB (K4)	158,61 ± 2,0076 ^{(a)(b)}	90,43±2,0750 ^{(a)(b)}	23,68±2,0398 ^{(a)(b)}	54,61±1,0402 ^{(a)(b)}
SNKEER 100mg/kgBB (K5)	133,94 ± 3,9357 ^{(a)(b)}	80,87±4,7129 ^{(a)(b)}	30,90±1,2866 ^{(a)(b)}	51,84±1,883 ^{(a)(b)}

Keterangan: SD = Standar Deviasi. (a) adalah nilai signifikansi kelompok perlakuan terhadap kelompok hiperkolesterol ($p < 0,05$) (b) adalah nilai signifikansi kelompok perlakuan terhadap kelompok normal ($p < 0,05$).



Gambar. 1 Diagram kadar rata-rata profil lipid tiap kelompok

Selanjutnya penumpukan kolesterol dalam tubuh diikuti dengan aktivitas radikal bebas yang dapat menyebabkan adanya kerusakan oksidatif pada jaringan. Peningkatan radikal bebas pada hiperkolesterol berhubungan dengan peningkatan oksidasi LDL pada dinding arteri yang mendorong terjadinya disfungsi sel endotel, dan pengembangan aterosklerosis (Aikawa dan Libby, 2004; Takehashi *et al*, 2005).

Bunga rosela telah diketahui banyak mengandung senyawa seperti alkaloid, antosianin, *arachidic acid*, anisaldehida, *cyandin-3-rutinoside*, *procatechuic acid*, polisakarida, quercetin. Senyawa polifenol yang terkandung dalam bunga rosela diduga memiliki peranan penting dalam mengurangi stress oksidatif, melalui mekanismenya sebagai antioksidan langsung pada lipoprotein-partikel (V. Hirunpanich *et al*, 2006). Flavonoid dan senyawa polifenol dapat menangkap radikal bebas dan dapat memicu aktivitas berbagai sistem enzim karena dapat berinteraksi dengan berbagai molekul, kebanyakan senyawa fenolik memiliki efek positif pada tubuh karena dapat menangkap radikal bebas. Senyawa fenolik secara struktural mempunyai cincin fenolik dan substituen hidroksil yang mirip dengan vitamin E yang dapat berfungsi

efektif sebagai antioksidan karena kemampuannya dapat menetralkan hidroksil yang merupakan radikal bebas.

Efek antioksidan seduhan kelopak kering bunga rosela telah diteliti di berbagai *study* in vivo dan in vitro (Dinayati, 2010 ; Angelo, 2010 ; wijayanti, 2012). Namun *study* mengenai pengaruh pemberian Sediaan Nanopartikel Kitosan Ekstrak Etanol Rosela (SNKEER) masih belum banyak dilaporkan. Dari hasil penelitian yang diperoleh pengobatan tikus hiperkolesterol dengan menggunakan SNKEER dosis 25mg/kgBB, 50mg/kgBB, dan 100mg/kgBB selama 30 hari dapat menurunkan kadar kolesterol total, trigliserida, LDL, serta dapat meningkatkan kadar HDL secara signifikan, dan bila dilihat pada grafik diatas antara dosis 25mg/kgBB, 50mg/kgBB, dan 100mg/kgBB menunjukkan bahwa terjadi peningkatan efektifitas seiring dengan adanya peningkatan dosis. Hal ini juga dikarenakan adanya modifikasi menjadi nanopartikel dengan tujuan dapat membantu meningkatkan penyerapan senyawa-senyawa yang terkandung dalam ekstrak rosella, menurut Gupta *et al* (2006), dengan membuat sediaan menjadi nanopartikel akan dapat meningkatkan luas permukaan, sehingga dapat meningkatkan jumlah obat yang terabsorpsi, serta dapat meningkatkan aseptabilitas karena dapat memperbaiki sifat

fisik dari senyawa aktif yang mempunyai sifat asam (Mohanraj dan Chen, 2006). Hal ini sejalan dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Rizki (2014) dengan hasil optimasi formulasi terbaik untuk sediaan nanopartikel kitosan ekstrak etanol rosela (SNKEER) memiliki perbandingan 2:1:1/10 (Ekstrak Etanol Rosela : Kitosan : TPP) dengan pelarutan kitosan pada pH 4 ukuran partikel 101,7 nm dan *entrapment efficiency* sebesar 80,24% yang selanjutnya telah dilakukan pengukuran kadar MDA secara invitro hasilnya bahwa SNKEER dapat menurunkan kadar MDA bila dibandingkan dengan kelompok yang tidak diberi SNKEER.

KESIMPULAN

Dari hasil di atas menunjukkan bahwa modifikasi menjadi bentuk sediaan nanopartikel menurunkan kadar kolesterol total, trigliserida, dan kadar LDL, serta dapat meningkatkan kadar HDL bila dibandingkan dengan kelompok normal. Adapun kelompok yang paling baik dalam menurunkan kadar kolesterol total, trigliserida, LDL, serta meningkatkan kadar HDL yaitu pada kelompok 5 pada dosis pemberian SNKEER 100 mg/kgBB/hari.

DAFTAR PUSTAKA

- Agoreyo, F. O., B. O. Agoreyo, and M. N. Onuorah. 2008. "Effect of Aqueous Extracts of Hibiscus Sabdariffa and Zingiber Officinale on Blood Cholesterol and Glucose Levels of Rats." *African Journal of Biotechnology* 7(21).doi:10.4314/ajb.v7i21.59487.http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/59487.
- Aikawa, M., Libby, P., 2004. The vulnerable atherosclerotic plaque: pathogenesis and therapeutic approach. *Cardiovascular Pathology* 13, 125–138.
- Angelo, M., 2010, Pengaruh Pemberian Seduhan Kelopak Kering Bunga Rosela (*Hibiscus sabdariffa*) Terhadap Kadar Trigliserida Serum Tikus SD Hiperkolesterolemik, *Karya Tulis Ilmiah*, Program Pendidikan Sarjana Kedokteran Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro, Semarang.
- Anonim., 2004, *Ekstrak Tumbuhan Indonesia, Volume 2*, Badan Pengawasan Obat dan Makanan Republik Indonesia.
- Dinayati, T., 2010, Pengaruh Pemberian Seduhan Kelopak Kering Bunga Rosela (*Hibiscus sabdariffa*) Terhadap Kadar Kolesterol Total Serum Tikus SD.
- Gupta, V. Karar, P. Ramesh, S. Misra, S. And Gupta, A. 2010. *Nanoparticle Formulation for Hydrophilic & Hydrophobic Drugs*. Int. J. Res. Pharm. Sci. Vol-1, Issue-2, 163-169.
- Harborne, J.B., 1973, *Phytochemical methods*, London. Chapman and Hall, Ltd., Pp. 49-188.
- Hirunpanich v, Anocha Utaipat, Noppawan Phumala Marales, Nuntavan Bunyapraphatsara, Hitoshi Sato, Angkana Herunsale, Chuthamane Suthisang, 2006, Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous extracts from the dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. in
- Mohanraj and Chen, 2006, *Nanoparticles – A Review*, Trop J Pharm Res, June 2006; 5 (1) : 561-573.
- Muchtar, H., Reci Ariati., Helmi Arifin , 2012, Pengaruh fraksi air kelopak bungarosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) terhadap kadar kolesterol darah tikus putih jantan hiperkolesterol dan hiperkolesterol-disfungsi hati, Tesis, Universitas Andalas, Sumatra Barat.
- Poulain, N. and Nakache, E. 1998, Nanoparticles from vesicles polymerization. II. Evaluation of their encapsulation capacity. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.*, 36: 3035–3043.
- Riski I., 2014, *Formulasi Nanopartikel Kitosan Ekstrak Bunga Rosella (*Hibiscus Sabdariffa* L.) Dan Uji Aktivitas Antioksidan Pada Sel Darah Merah Domba*, Tesis, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta.
- Shoo, S.K. and Labhasetwar, V., 2006, Nanopartikel interface: An Important

Determinant in Nanoparticles-Mediated Drug/Gene Delivery in Nanoparticle Technology for Drug Delivery, Taylor & Francis Group, New York, pp. 140-150.

Takahashi, Y., Zhu, H., Yoshimoto, T., 2005. Essential roles of lipoxygenases in LDL oxidation and development of atherosclerosis. *Antioxidant and Redox Signaling* 7, 425–431.

Wijayanti, R., 2013, *Efek Ekstrak Etanol Kelopak Bunga Rosela (Hibiscus*

Sabdariffa L.) Terhadap Penurunan Kadar Gula Darah, Kolesterol, Trigliserida Serta Histopatologi Pankreas Tikus Putih Galur Sprague Dawley Yang diinduksi 7,12 Dimetilbenz(a)Antrasen, Tesis, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta.

WorldHealthOrganization.2006. Mortality country fact sheet. WorldHealthStatistica.