EFEK EKSTRAK ETANOL DAUN GEDI MERAH *(Abelmoschus manihot* (L.) Medik) TERHADAP KADAR *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF-α) GINJAL DAN JUMLAH NEKROSIS SEL EPITEL GLOMERULUS GINJAL PADA TIKUS MODEL DIABETES MELITUS

Rika Nurasidah[1], Juliet Tangka[2], Helmin Elyani[1], Yudi Purnomo[1]*
[1]*Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang*
[2] *Departemen Farmasi, Politeknik Kesehatan Manado, Kementerian Kesehatan, Manado, Indonesia*

*Corresponding author email : yudi.purnomo@unisma.ac.id
MT. Haryono 193 Malang, Jawa Timur, Indonesia, 65144 Tel. (0341) 558959

ABSTRAK

Pendahuluan: Hiperglikemia kronis berkontribusi terhadap peningkatan risiko komplikasi nefropati diabetik. Daun gedi merah dikenal memiliki efek antidiabetik. Penelitian tentang ekstrak etanol daun gedi merah untuk mencegah komplikasi nefropati diabetik jarang dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan efek ekstrak etanol daun gedi merah dalam mencegah komplikasi nefropati diabetik dengan mengamati kadar TNF-α dan jumlah nekrosis sel epitel glomerulus ginjal tikus model DM.

Metode: Tikus *sprague dawley* jantan berusia 4-6 minggu dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu 2 kelompok kontrol yaitu kontrol normal (KN), kontrol DM (KDM), dan 3 kelompok perlakuan yaitu kelompok Ekstrak Etanol Daun Gedi Merah dosis 200mg/kgBB, 400mg/kgBB, dan 800 mg/kgBB (n=5 ekor). Hewan coba diinduksi diet tinggi lemak-fruktosa (DTLF) dan *Stretpzotocin* (STZ) 25 mg/kgBB i.p. Selanjutnya diberikan EEDGM selama 4 minngu. Pengukuran kadar TNF-α ginjal menggunakan *TNF-α rat kit* dan pengukuran jumlah sel nekrosis menggunakan rumus proporsi (%). Analisa data menggunakan One Way Anova dilanjutkan dengan uji LSD ($p<0,05$).

Hasil: Induksi DTLF dan STZ meningkatkan kadar TNF-α ginjal dan jumlah nekrosis sel epitel glomerulus. Pemberian EEDGM dosis 200,400,dan 800mg/kgBB menghambat peningkatan kadar TNF-α ginjal masing-masing 2%, 3%, dan 4% dibandingkan kelompok KDM ($p<0,05$). Sedangkan pemberian EEDGM dosis 200,400, dan 800mg/kgBB menghambat jumlah nekrosis sel epitel glomerulus ginjal sekitar 20%, 25%, dan 7% dibandingkan KDM ($p<0,05$).

Kesimpulan: Pemberian EEDGM menghambat peningkatan kadar TNF-α ginjal dan jumlah nekrosis sel epitel glomerulus pada tikus model diabetes melitus.

Kata Kunci: *Diabetes melitus, Tumor Necrosis Alpha, Inflamasi, Nekrosis*

EFFECT ETHANOLIC EXTRACT OF *Abelmoschus manihot (L.) Medik* ON RENAL *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF-α) LEVELS AND GLOMERULAR EPITHELIAL CELL NECROSIS LEVELS IN DIABETIC RAT MODEL

ABSTRACT

Introduction : Chronic hyperglycemia contributes to increased risk of nephropathy diabetic complications. *Abelmoschus manihot (L.) Medik* has potential as antidiabetic that are used as alternative therapics for diabetic nephropathy in diabetes. This study aims to determine the effect ethanol extract of red *Abelmoschus manihot (L.) Medik* could decreased on renal TNF-α level and the number of necrosis of renal glomerular epithelial cells in diabetic rat model.

Methods : This study use 4-6-weeks-old *Sprague dawley* male rats which divided into normal group, diabetes mellitus group, and ethanol extracts of gedi merah leaves doses 200 mg/kgBW, 400 mg/kgBW, 800 mg/kgBW (n = 5 rats). The rats were induced HFFD and STZ injection i.p. The rats were administrated orally EEDGM for 4 weeks. The level of TNF-Alfa kidney was measured using *TNF-α rat kit* on, while necrosis of the renal glomerular epithelial cells uses the ratio formula in (%). Statistical analysis using One Way ANOVA continued with LSD test ($p <0.05$).

Results : DTLF and STZ induction increases TNF-α kidney levels and necrosis of renal glomerular epithelial cells. EEDGM dose 200, 400, and 800mg/kgBW inhibit the increase TNF-α kidney levels approximately 2%,3%,and 4%. EEDGM doses 200,400, and 800mg/kgBW significantly decreased glomerular renal ephitelial cell necrosis in rats with DM of 20%, 25%, and 7%.

Conclusion : Ethanolic extract of *Abelmoschus manihot* (L.) Medik could inhibit the increase in TNF-α kidney levels and decreased necrosis of glomerular epitheial cells

Keywords: *Diabetes mellitus, Tumor Necrosis Alpha, Inflamation, Necrosis*

PENDAHULUAN

Komplikasi nefropati pada diabetes melitus (DM) masih menjadi permasalahan di dunia. Nefropati Diabetik (ND) merupakan sindrom klinik pada pasien DM yang menimbulkan *end-stage renal disease* (ESRD) ditandai dengan adanya makroalbuminuria persisten[7]. Antara tahun 2009 – 2011, ESRD merupakan komplikasi ND yang terjadi pada 60% pasien DM di Malaysia, Meksiko dan Singapura[4]. Di Indonesia sekitar 20 - 40% pasien DM mengalami kerusakan pada ginjal sebagai akibat komplikasi diabetik[8]. Menurut studi prospektif di Inggris, angka kematian akibat komplikasi nefropati diabetik akan meningkat 25% dalam 10 tahun kedepan[7].

Hiperglikemia kronik akan merusak organ tubuh. Salah satu organ yang mengalami kerusakan yaitu ginjal. Keadaan tersebut akan menimbulkan peningkatan filtrasi glukosa dan menyebabkan glukosuria. Hal ini memicu peningkatan aktivasi jalur metabolik intraseluler yaitu *polyol pathway*, *Advanced-Glycation End Products* (AGEs), *Protein Kinase C* (PKC) dan *hexosamine pathway* sehingga terjadi peningkatan *Reactive Oxygen Spesies* (ROS)[33,35]. Kerusakan oksidatif menimbulkan reaksi inflamasi yang memicu pengeluaran sitokin pro-inflamasi seperti TNF-α[37]. TNF-α merupakan penginduksi utama peradangan mikrovaskular ginjal yang berperan pada progresifitas kerusakan glomerulus[40]. TNF-α berikatan dengan reseptornya yaitu TNFR-1 melalui aktivasi RIPK-1 yang akan menimbulkan proses kematian sel nekrosis pada jaringan ginjal[1].

Pengendalian kadar glukosa darah dalam mencegah komplikasi nefropati diabetik melalui pemberian obat antidiabetik (OAD). OAD golongan biguanid salah satunya metformin berperan meningkatkan sensitivitas insulin dan golongan sulfonilurea meningkatkan sekresi insulin. Pemberian OAD dalam jangka panjang menimbulkan efek yang merugikan. Metformin berpotensi menimbulkan *lactic acid* dan nefrotoksik, sedangkan golongan sulfonilurea berpotensi menimbulkan hipoglikemia[41]. Efek yang merugikan tersebut mendorong pencarian sumber alternatif bahan obat yang berasal dari herbal.

Tanaman herbal daun gedi merah *(Abelmoschus manihot* (L.) Medik) memiliki efek anti diabetik, antioksidan dan anti-inflamasi. Daun gedi merah dikenal masyarakat Sulawesi Utara sebagai obat tradisional untuk pengobatan kencing manis, sakit ginjal, dan kolesterol tinggi[5,11]. Berdasarkan uji preklinik, ekstrak daun gedi merah mengandung senyawa aktif flavonoid dan alkaloid yang diduga memiliki efek anti diabetik. Flavonoid diduga memiliki efek meningkatkan sensitivitas reseptor insulin, bertindak sebagai antioksidan, dan sebagai anti-inflamasi dalam menghambat sitokin pro-inflamasi[14,29]. Sedangkan alkaloid diduga memiliki kemampuan untuk regenerasi sel β pankreas[14]. Berdasarkan latar belakang diatas, penelitian efek ekstrak daun gedi merah terhadap komplikasi nefropati perlu dilakukan dengan mengamati kadar TNF-α dan jumlah nekrosis sel epitel glomerulus pada organ ginjal tikus model DM.

METODE

Penelitian ini menggunakan experimental laboratorium secara *in vivo* dengan desain *control group post test only.* Penelitian ini telah disetujui oleh komisi etik Universitas Brawijaya Malang dengan sertifikat etik No.028--KEP-UB-2020. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Hewan coba pada penelitian ini adalah tikus jantan galur *Sprague dawley* usia 4-6 minggu dengan berat badan sekitar 180-200 gram.

Pembuatan Tikus Model Diabetes Melitus

Pembuatan tikus model DM yaitu dengan menginduksi diet tinggi lemak dan fruktosa (DTLF) dan injeksi *streptozotocin* (STZ) dosis 25mg/kgBB *multiple dose* secara intraperitoneal (ip). Komposisi pembuatan diet tinggi lemak (DTL) yaitu kuning telur (4%), minyak kambing (6,5%), minyak babi (6,5%), asam kolat (0,2%), pakan ayam (82,8%) dan air secukupnya. Bahan tersebut dicampur kemudian dibentuk bulat dan diberikan sebanyak 25gram/hari setiap sore[6]. Sedangkan pada pemberian diet tinggi fruktosa (DTF) dengan membuat larutan fruktosa 20% yang terdiri dari 200 ml fruktosa dicampur aquades 1000 ml. Dosis yang diberikan sebanyak 40ml/hari *ad libitum*[3]. Pemberian STZ dilakukan pada minggu ke-4 pemberian DTLF dengan dosis 25mg/kgBB[15]. Tikus dikatakan DM apabila kadar glukosa darah puasa ≥ 126 mg/dL[12].

Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Gedi Merah

Daun gedi merah (*Abelmoschus manihot* (L.) Medik) sudah mendapatkan surat keterangan determinasi nomor 074/193A/102.7/2020 dari Balai Materia, Batu Jawa Timur. Proses ekstraksi dilakukan dengan metode sokhletasi. Ektraksi mengalami sirkulasi berulang sekitar 6 kali siklus. Proses sokhletasi dihentikan apabila kepekatan pelarut berkurang[13]. Kemudian, ekstrak diuapkan dengan *rotary evaporator* untuk mendapatkan bentuk pasta. Dosis EEDGM pada penelitian ini mengacu pada penelitian Tandi *et al* (2016) yang sedikit dimodifikasi yaitu 200mg/kgBB, 400mg/kgBB, dan 800mg/kgBB.

Preparasi Sampel Organ Ginjal

Pengorbanan tikus dilakukan dengan injeksi ketamine 0,2 ml secara intamuskular (IM).

Pembedahan tikus dilakukan secara vertkal mengikuti linea media hingga seluruh abdomen-thorax terbuka. Setelah itu, dilakukan pengambilan organ ginjal. Organ ginjal dibilas dengan larutan *Natrium choride* (NaCl) sebanyak 3 kali dan dilanjutkan pembilasan dengan larutan *Phosphate Buffer Saline* (PBS). Tahapan selanjutnya yaitu menimbang organ ginjal 100 mg. kemudian, dihancurkan dengan mortar dan ditambahkan cairan PBS dengan perbandingan 1:10. Sampel yang sudah halus dimasukan ke tabung *eppendorf* untuk dimasukan dalam refrigenerator pada suhu -40^{o}C dan kemudian di *centrifuge* pada kecepatan 4000rpm selama 15 menit untuk mendapatkan supernatant sampel. Sebagian ginjal dimasukan ke dalam tabung yang berisi formalin 37% untuk dilakukan preparasi histopatologi *Hematoxylin-Eosin* (HE).

Pengukuran Kadar TNF-α Jaringan Ginjal

Pengukuran sampel dilakukan dengan memasukan 100µl larutan standard an 100µl supertanatan sampel ke dalam *well*. Setelah itu, ditambahkan 100µl *Biotinylated Detection Ab* dan diinkubasi pada suhu 37^{0}C selama 1 jam. Dilakukan aspirasi dengan menggunakan 350µl *Wash buffer*, kemudian ditambahakan 100µl HRP *Conjugate* untuk diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37^{0}C. Setelah diaspirasi dan dicuci kemudian ditambahkan 50 µl *stop solution* pada setiap *well*. Kemudian dilakukan penentuan hasil niali OD dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 450nm dan hasil dikonversi dalam satuan pg/mL dalam kurva standar linear.

Pemeriksaan dan Perhitungan Nekrosis Sel Glomerulus

Setelah dilakukan preparasi organ ginjal dan pembuatan preparat histologi dengan pewarnaan HE. Pengamatan jumlah sel epitel glomerulus menggunakan mikroskop *Dot slide* dengan perbesaran lensa okuler 400x pada 5 lapang pandang. Perhitungan jumlah nekrosis sel epitel glomerulus dengan bantuan aplikasi *OlyVIA* dan diamati oleh 3 orang pengamat, kemudian hasil 3 pengamat dirata-rata untuk mendapatkan jumlah hasilnya. Nekrosis sel ditandai dengan inti sel yang mengecil/piknotik, pecah/karioreksis, dan menghilang/kariolisis. Perhitungan nekrosis sel ginjal menggunakan rumus proporsi yaitu (%) = $\frac{a}{b}\ x\ 100\%$.

Keterangan :
a = Jumlah sel nekrosis
b = Jumlah keseluruhan sel

Analisa Statistik

Data yang diperoleh dilakukan uji normalitas dan homogenitas terlebih dahulu kemudian setelah dinyatakan terdistribusi normal dapat dilakukan uji beda menggunakan statistik parametric yaitu *one way* ANOVA. Selanjutnya dilakukan uji *least significance diffetent* (LSD) untuk mengetahui perbandingan antar perlakuan. Hasil dinyatakan bermakna apabila nilai p<0,05. Analisa data dilakukan dengan memakai software statistic SPSS.

Karakteristik Sampel

Berdasarkan tabel 1, berat badan (BB) pra perlakuan relatif tidak berbeda antar kelompok. Berat badan pasca perlakuan cenderung meningkat pada semua kelompok dibandingkan BB pra perlakuan. Kelompok perlakuan EEDGM dosis 200-800mg/kgBB menunjukan berat badan yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol DM (KDM). Sedangkan BB pada kelompok normal (KN) lebih besar dibandingkan KDM.

Persentase asupan makan tertinggi pada kelompok KN sedangkan terendah pada kelompok EEDGM 200mg/kgBB. KGDP pra-perlakuan

HASIL DAN ANALISA DATA

Karakteristik Sampel

Pada penelitian ini didapatkan hasil karakteristik hewan coba yang tercantum dalam **tabel 1.**

n=5	KN	KDM	EEDGM-1 200 mg/KGBB	EEDGM-2 400 mg/KGBB	EEDGM-3 800 mg/KGBB
BB pra perlakuan (g)	242.8±12.7	230.4±11.5	246.8±18.9	256.2±32.20	253.0±25.08
BB pasca perlakuan (g)	335.4±34.9^{a}	279.2±54.0^{b}	304.80±52.0	324.8±24.1	315.5±43.0^{a}
Δ BB (g)	92.6±27.6	48.8±44.5	58.0±48.9	68.6±33.2	80.6±10.7
Asupan Pakan (%)	89.6±9.6	84.8±7.7	77.6±15.1	86.4±9.21	81.6±12.2
KGDP awal (mg/dL)	74.6±3.0	85.0±8.5	83.2±5.3	87.6±3.9	81.6± 3.2
KGDP pra- perlakuan (mg/dL)	100.0±7.9	182.6±43.1	171.6±11.6	172.2±26.6	163.6±9.9
KGDP pasca- perlakuan (mg/dL)	111.6±5.9^{a}	149.8±11.1^{b}	130.6±4.8^{c}	120.8±11.4^{d}	113.8±5.7^{e}

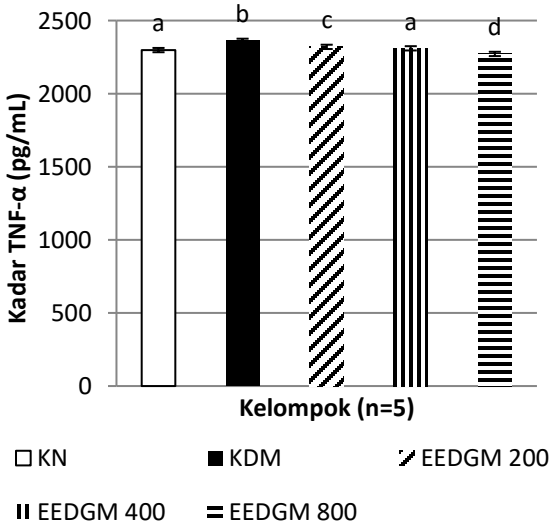
Tabel 1.1 Karakteristik Sampel

Keterangan: Data dalam mean ± SD. Uji statistik menggunakan *One Way Anova* dan *Post Hoc LSD test*, BB: Berat Badan, Δ BB: selisih BB akhir dan awal, KGDP : Kadar Glukosa Darah Puasa, KN: Kelompok Normal, KDM: Kelompok Diabetes Melitus, EEDGM: pemberian ekstrak etanol daun gedi merah. Notasi yang berbeda menunjukkan signifikansi (p<0.05).

cenderung meningkat pada kelompok KDM dan kelompok perlakuan EEDGM 200-800mg/kgBB setelah induksi DM. KGDP pasca perlakuan pada kelompok EEDGM lebih tinggi dibandingkan kelompok KN. KGDP pasca perlakuan pada kelompok KDM lebih tinggi dibandingkan kelompok KN.

Efek Ekstrak Etanol Daun Gedi Merah terhadap Kadar TNF-α Jaringan Ginjal Tikus Model Diabetes Melitus

Efek ekstrak etanol daun gedi merah (EEDGM) terhadap kadar TNF-α ginjal tikus model DM dapat dilihat pada **gambar 1.**



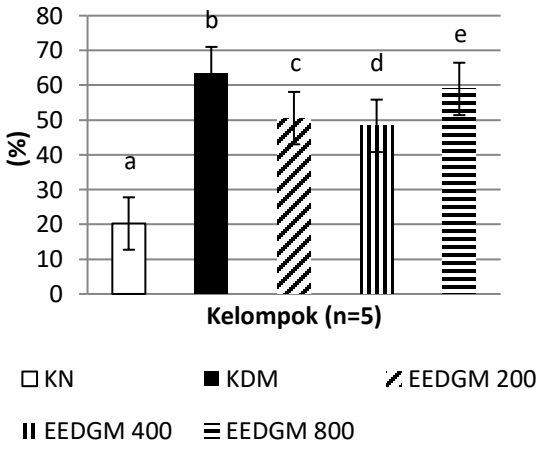
Gambar 1. Histogram Kadar TNF-α Jaringan Ginjal Tikus Model Diabetes Melitus yang telah diberikan Esktrak Etanol Daun Gedi Merah (EEDGM)

Keterangan: a,b,c.. = huruf berbda menunjukan perbedaan signifikan (p<0,05, *LSD Test*) terhadap kadar TNF-α tikus model DM.

Pemberian ekstrak etanol daun gedi merah dosis 200, 400, dan 800mg/kgBB secara signifikan menghambat peningkatan kadar TNF-α berturut – turut 2%, 3% dan 4% dibandingkan kelompok KDM (p<0,05). Pada perlakuan EEDGM dosis 400mg/kgBB menghambat peningkatan kadar TNF-α ginjal hingga tidak berbeda dengan KN (p>0,05). Induksi DTLF dan STZ pada kelompok KDM meningkatkan kadar TNF-α sekitar 3% dibandingkan kelompok KN (p<0,05).

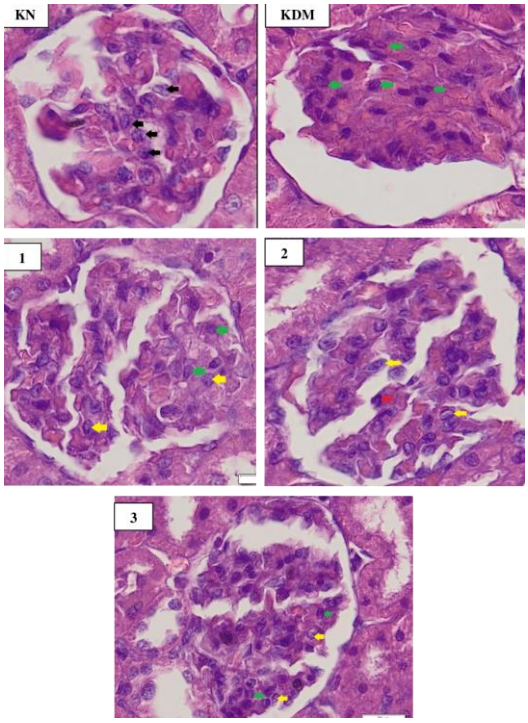
Jumlah Nekrsosis Sel Epitel Glomerulus Ginjal Tikus Model DM yang Diberikan Ekstrak Etanol Daun Gedi Merah (EEDGM)

Efek EEDGM terhadap jumlah nekrosis sel epitel glomerulus ginjal tikus model DM dapat dilihat pada **gambar 2.**



Gambar 2. Jumlah Nekrsosis Sel Epitel Glomerulus Ginjal Tikus Model DM yang Diberikan Ekstrak Etanol Daun Gedi Merah (EEDGM)

Keterangan: a,b,c.. = huruf berbda menunjukan perbedaan signifikan (p<0,05, *LSD Test*) terhadap kadar TNF-α tikus model DM.



Gambar 3. Histopatologi Sel Epitel Glomerulus Tikus Diabetes Melitus

Keterangan: Gambaran histopatologi glomerulus ginjal dengan pewarnaan HE perbesaran 400x Pada kelompok KN; KDM; (1) EEDGM dosis 200mg/kgBB; (2) EEDGM 400mg/kgBB; (3) EEDGM 800mg/kgBB. Tanda panah hitam (➡ menunjukan normal; merah (➡)menunjukan piknosis; kuning (➡) menunjukan kariolisis; warna hijau (➡ menunjukan karioreksis.

Pemberian ekstrak etanol daun gedi merah dosis 200, 400, dan 800mg/kgBB secara signifikan menghambat peningkatan jumlah nekrosis sel epitel glomerulus berturut – turut sekitar 20%, 25%, dan 7% dibandingkan kelompok KDM ($p<0,05$), namun pada dosis 800mg/kgBB masih sedikit meningkat dibandingkan kelompok perlakuan lainnya. Terdapat perbedaan signifikan antara kelompok EEDGM dosis 200, 400, dan 800mg/kgBB dalam menghambat jumlah nekrosis sel epitel glomerulus ($p<0,05$). Pemberian DTLF dan STZ pada kelompok KDM meningkatkan jumlah nekrosis sel epitel glomerulus 3 kali lipat dibandingkan kelompok KN ($p<0,05$).

PEMBAHASAN

Efek Pemberian DTLF dan STZ terhadap Kadar TNF-α ginjal dan jumlah nekrosis sel epitel glomerulus

Pada kelompok KDM didapatkan peningkatan kadar TNF-α sekitar 3% dan jumlah nekrosis sel epitel glomerulus ginjal sekitar 3 kali lipat dibandingkan kelompok KN. Hal ini dikarenakan induksi DTLF dan STZ jangka panjang akan meyebabkan hiperglikemia kronis dan menimbulkan kerusakan pada organ ginjal. Diet tinggi lemak (DTL) menimbulkan peningkatakn TG dan FFA sehingga terjadi peningkatan fosforilasi serin/*threonine* dan penurunan fosforilasi tirosin yang akan mengganggu aktivitas IRS 1 dan 2 untuk berikatan dengan P13K. Gangguan pada IRS 1 dan 2 menimbulkan hambatan *upatake* glukosa masuk ke dalam sel oleh GLUT-4 sehingga terjadi penurunan sensitifitas reseptor insulin yang memicu resistensi insulin dan terjadi hiperglikemia[16,17,18].

Pemberian diet tinggi fruktosa (DTF) meningkatkan metabolisme fruktosa di hepar. Fruktosa masuk ke saluran intestinal dan diserap di sel enterosit melalui transporter GLUT-5. Sebagian besar fruktosa diabsorbsi diusus dan dibawa oleh sirkulasi menuju vena porta dan masuk ke sel hepar melalui transporter GLUT-2. Di hepar, fruktosa diubah menjadi fruktosa-1-fosfat oleh enzim fruktokinase yang kemudian diubah menjadi triose fosfat oleh enzim aldolase B[19]. Penumpukan triose fosfat menstimulasi pembentukan glikogen dan sintesis asam lemak dari karbon fruktosa yang dikenal dengan de novo lipogenesis (DNL). Fruktosa yang menginduksi DNL dengan adanya atom karbon (gliserol-3-fosfat dan asil-KoA) diubah menjadi monoasilgliserol dan diasilgliserol (DAG). Kemudian DAG diubah menjadi trigliserida dan VLDL yang menimbulkan resistensi insulin[20].

Induksi STZ menyebabkan destruksi sel β pankreas. STZ masuk melalui pembuluh darah vena mesentarika superior dan vena linealis yang menyatu membentuk vena porta dan masuk ke hepar. Kemudian STZ masuk ke sel β pankreas melalui GLUT-2 yang memicu reaksi antara gugus metil dari STZ dengan molekul DNA sehingga menimbulkan alkilasi DNA dan fragmentasi DNA. Alkilasi DNA memicu peningkatan *Poly ADP-Ribose Polymerase* (PARP) yang menyebabkan defosforilasi ATP akibat penurunan *Nicotinamide Adenine Dinucleotid* (NAD^+) dan ATP sel sel β pankreas sehingga terjadi penurunan dari produksi insulin[21]. Keadaan resistensi insulin dan penurunan sekresi insulin berperan terhadap hiperglikemia. Hal ini juga sesuai dengan adanya peningkatan KGDP pra perlakuan pada kelompok KDM dan kelompok perlakuan EEDGM.

Mekanisme induksi DTLF dan STZ jangka panjang menimbulkan hiperglikemia kronis yang akan merusak organ ginjal dengan adanya peningkatan filtrasi glukosa. Hal ini meninmbulkan aktivasi jalur metabolik inraseluler yang memicu peningkatan *Reactive Oxygen Spesies* (ROS)[33,35]. Ketidakseimbangan antara peningkatan ROS dan antioksidan menimbulkan *stress oxidative* yang berakibat pada kerusakan sel epitel glomerulus ginjal[2]. Kerusakan oksidatif menimbulkan reaksi inflamasi yang memicu pengeluaran sitokin pro-inflamasi seperti TNF-α yang ada di sel renal (mesangial, glomerular, dan endotel)[37]. TNF-α dengan reseptornya yaitu TNFR-1 melalui aktivasi RIP Kinase-1 (*Receptor Interacting Protein -1)* akan menimbulkan proses kematian sel yaitu nekrosis pada jaringan ginjal[1].

Efek Ekstrak Etanol Daun Gedi Merah terhadap Kadar TNF-α Ginjal Tikus Model Diabetes Melitus

Pemberian EEDGM dapat menghambat peningkatan kadar TNF-α ginjal. Hal ini di duga karena kandungan senyawa aktif pada EEDGM memiliki kemampuan sebagai antiinflamasi, antioksidan, dan antidiabetik. Kandungan senyawa pada ekstrak tersebut yaitu flavonoid (*hyperoside, isoquercitrin, rutin, quercetin, dan myricetin*), alkaloid, polifenol dan saponin[14,26,34]. Mekanisme senyawa aktif yang berperan secara langsung sebagai antiinflamasi dan antioksidan sebagai berikut. Senyawa aktif dari flavonoid yaitu *quercetin* diduga berperan sebagai antiinflamasi melalui penurunan aktivitas faktor transkripsi *Nuclear factor kappa B* (Nf-kB) sehingga sintesis mediator proinflamasi TNF-α menurun[26,30,31]. Selain itu, senyawa aktif dari daun gedi merah diduga memiliki potensi menghambat peningkatan TNF-α dengan menurunkan aktivitas ROS sehingga menghambat terjadinya kerusakan oksidatif di jaringan[14]. Polifenol berperan sebagai *scavenger* radikal hidroksil dan superhidroksil sehingga menurunkan produksi ROS. Senyawa golongan flavon yaitu *3,3',5 trihydroxy-4'methoxy flavone* memiliki aktivitas sebagai antioksidan dengan bertindak sebagai donor elektron

terhadap radikal bebas[29]. Adanya penurunan faktor transkripsi Nf-kB dan produksi ROS menyebabkan hambatan pada kerusakan oksidatif jaringan sehingga tidak terjadi inflamasi dan pelepasan sitokin pro-inflamasi TNF-α akan menurun.

Potensi EEDGM selain antiinflamasi dan antioksidan yaitu antidiabetik yang secara tidak langsung menghambat peningkatan kadar TNF-α melalui mekanisme sebagai berikut. Senyawa flavonoid diduga memiliki kemampuan sebagai antidiabetik dengan menghambat aktivitas enzim α-glukosidase sehingga dapat menurunkan kadar glukosa darah dan mampu meregenerasi sel-sel β-pankreas yang rusak sehingga mampu mengatasi defisiensi insulin[27]. Senyawa saponin yang merupakan glikosida alamiah terikat dengan steroid atau triterpena dapat menurunkan kadar glukosa darah dengan menghambat aktivitas enzim α-glukosidase sehingga terjadi penurunan *uptake* glukosa[14]. Sedangkan senyawa alkaloid diduga berperan menurunkan kadar glukosa darah dengan regenerasi sel β pankreas sehingga produksi insulin meningkat[14]. Potensi antidiabetik pada EEDGM mampu menghambat hiperglikemia pada tikus model diabetes melitus. Mekanisme senyawa aktif tersebut sejalan dengan penelitian yang dilakukan Tandi (2016) menyatakan bahwa ekstrak etanol daun gedi merah mampu menghambat hiperglikemia pada tikus model diabetes melitus sehingga akan menurunkan pelepasan sitokin pro inflamasi seperti TNF-α.

Pada penelitian ini, pemberian EEDGM dosis 200, 400, dan 800mg/kgBB berbeda signifikan dalam menghambat peningkatan kadar TNF-α ginjal tikus model DM. Semakin tinggi dosis yang diberikan maka akan semakin kuat dalam menghambat peningkatan kadar TNF-α ginjal. Hal ini sesuai dengan teori farmakologi yaitu semakin tinggi dosis maka akan semakin memiliki efek yang baik.

TNF-α merupakan sitokin pro-inflamasi yang sumber utamanya dari makrofag, sel limfosit dan sel NK[22]. TNF-α juga bisa disekresi dari sel intrinsik ginjal seperti sel endotel, mesangial, glomerular, dan sel epitel tubular[37]. TNF-α berperan mengatur aktivasi, diferensiasi, proliferasi sel dan sebagai respon imun terhadap reaksi inflamasi maupun kerusakan jaringan dan penginduksi utama peradangan mikrovaskular ginjal yang berperan pada progresifitas kerusakan glomerulus[23,40]. TNF-α berikatan dengan reseptornya yaitu TNR-1 melalui aktivasi RIP Kinase-1 (*Receptor Interacting Protein - 1)* akan menimbulkan proses kematian sel yaitu nekrosis pada jaringan ginjal[1].

Efek Ekstrak Daun Gedi Merah Terhadap Jumlah Nekrosis Sel Epitel Glomerulus Ginjal Model Tikus Diabetes Melitus

Pemberian EEDGM mampu menghambat peningkatan jumlah nekrosis sel epitel glomerulus ginjal. Hal ini diduga karena kandungan senyawa aktif EEDGM yang memiliki potensi sebagai antidiabetik, antioksidan, dan antiinflamasi. Mekanisme langsung dari senyawa aktif flavonoid diduga memiliki potensi sebagai antiinflamasi dengan menghambat jalur pembentukan prostaglandin sehingga tidak terjadi inflamasi yang akan menurunkan kerusakan sel[9]. Selain itu, kandungan senyawa aktif EEDGM secara tidak langsung berperan dalam menghambat peningkatan jumlah nekrosis sel epitel glomerulus dengan memperbaiki keadaan hiperglikemia sehingga menghambat terbentuknya radikal bebas yang sudah dijelaskan sebelumnya. Penurunan radikal bebas tersebut menghambat pelepasan sitokin pro-inflamasi TNF-α sehingga akan menurunkan jumlah nekrosis sel. Senyaawa aktif saponin diduga memiliki peran sebagai anti-inflamasi dengan menghambat jalur Nf-kB dan *mitogen-activated protein* (MAP) sehingga menurunkan kadar TNF-α. Penurunan kadar TNF-α akan menghambat peningkatan jumlah nekrosis sel[39]. Pada penelitian ini, pemberian EEDGM dosis 400mg/kgBB mampu menghambat peningkatan jumlah nekrosis sel epitel glomerulus lebih kuat dibandingkan dosis 200mg/kgBB. Hal ini sesuai dengan teori farmakologi yang dijelaskan sebelumnya. Pemberian EEDGM dosis 400mg/kgBB lebih kuat menghambat peningkatan jumlah nekrosis sel epitel glomerulus dibandingkan dosis 800mg/kgBB. Hal ini diduga pada dosis 800mg/kgBB kandungan flavonoid mengalami proses autooksidasi. Proses autooksidasi menyebabkan terbentuknya hidrogen peroksida, superoksida dan hidroksil radikal. Hal ini juga bisa disebabkan kandungan multikomponen pada daun gedi merah sehingga tidak terjadi peningkatan efek pada dosis dengan tingkatan berbeda[42].

Sel epitel glomerulus ginjal termasuk pada bentuk sel pipih selapis yang melapisi permukaan glomerulus. Epitel berfungsi sebagai barrier dan regulasi vaskular yaitu vasokonstriksi dan vasodilatasi. Kerusakan sel epitel melalui adanya *stress oxidative* jaringan yang akan mengalami peningkatan sitokin pro inflamasi TNF-α. Kerusakan sel tersebut ditandai dengan adanya gambaran piknotik, karioreksis, dan kariolisis. Piknotik ditandai dengan inti sel yang mengecil, memadat dan terlihat basofilik (biru). Karioreksis ditandai dengan inti yang bersegmen-segmen dan basofilik. Sedangkan kariolisis ditandai dengan inti sel yang menghilang atau lisis[25].

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian dan pembahasan diatas dapat disimpulkan bahwa :

1. Induksi DTLF dan STZ mampu meningkatkan kadar TNF-α ginjal dan

jumlah nekrosis sel epitel glomerulus pada tikus model diabetes melitus.
2. Pemberian ekstrak etanol daun gedi merah dosis 200, 400, dan 800mg/kgBB menghambat peningkatan kadar TNF-α ginjal tikus model diabetes melitus.
3. Pemberian ekstrak etanol daun gedi merah dosis 200, 400, dan 800mg/kgBB menghambat peningkatan jumlah nekrosis sel epitel glomerulus ginjal pada tikus model diabetes melitus.

SARAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disarankan bahwa:

1. Melakukan penelitian dengan metode *in silico* untuk mengetahui mekanisme kerja zat aktif yang terkandung dalam herbal daun gedi merah.
2. Melakukan penelitian efek ekstrak daun gedi merah terhadap nekrosis sel epitel glomerulus pada dosis ekstrak lebih dari 800mg/kgBB.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih disampaikan kepada Ikatan Orangtua Mahasiswa (IOM) dan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang karena telah membantu pendanaan dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Al-Lamki, R. S., & Mayadas, T. N. TNF receptors: signaling pathways and contribution to renal dysfunction. ***Kidney international***, 2015, *87*(2), 281–296. Doi: https://doi.org/10.1038/ki.2014.285
2. Amorim, R. G., Guedes, G., Vasconcelos, S., & Santos, J. Kidney Disease in Diabetes Mellitus: Cross-Linking between Hyperglycemia, Redox Imbalance and Inflammation. ***Arquivos brasileiros de cardiologia***, 2019, *112*(5),577–587. https://doi.org/10.5935/abc.20190077
3. Dupas, J., Goanvec, C., Feray, A., Guernec, A., Alain, C., Guerrero, F., & Mansourati, J. Progressive Induction Of Type 2 Diabetes:Effects Of A Reality–Like Fructose Enriched Diet In Young Wistar Rats. ***Plos One,*** 2016, *11*(1).
4. Lim, A.K.H. Diabetic Nephropathy-Complications and Treatment, ***International Journal of Nephrology and Renovascular Disease,*** 2014,*Vol 7.* 361-381. Doi: http://dx.doi.org/10.2147/IJNRD.S40172
5. Mamahit, L.P dan Soekamto, N.H. Satu Senyawa Asam Organik yang Diisolasi dari Daun Gedi (*Abelmoschus manihot L.* Medik) Asal Sulawesi Utara, ***Chem.Prog***, 2010, *Vol 3(1)*. 42-45.
6. Murwani, S., Ali, M., & Muliartha, K. Diet Aterogenik Pada Tikus Putih (Rattus Novergicus Strain Wistar) Sebagai Model Hewan Aterosklerosis. ***Jurnal Kedokteran Brawijaya,*** 2013, *22*(1), 6-9.
7. Nazar, Chaudhary, M.J. Diabetic Nephropathy; Principles of Diagnosis and Treatment of Diabetic Kidney Disease, ***Journal of Nephropharmacology***,2014, *Vol 3(1),* 15-20.
8. PERKENI. Pengelolaan dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 di Indonesia. Jakarta. PERKENI. 2015.
9. Jain, P.S., & Bari, S.B. Anti-Inflamatory Activity of *Abelmoschus manihot* Extracts. ***International Journal of Pharmacology,*** 2010, 6(4); 505-509.
10. Wajant, H., Pfizenmaier, K., & Scheurich, P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell death and differentiation*, 2003, *10*(1), 45–65. https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401189
11. South E., Kaempe H., & Tampi A. Evaluasi Kandungan Total Polifenol dan Isolasi Senyawa Flavonoid Pada Daun Gedi Merah (*Abelmoschus manihot* L.). ***Chem. Prog***, 2013, Vol 6 No 2.
12. Shirwaikar, A., Rajendran, K., & Barik, R. Effect of aqueous bark extract of Garuga pinnata Roxb. in streptozotocin-nicotinamide induced type-II diabetes mellitus. ***Journal of ethnopharmacology,*** 2016, *107*(2), 285–290. https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.03.012.
13. Sudaryanto, Herwanto T., & Putri, S.H. Aktivitas Antioksidan Pada Minyak Biji Kelor (*Moringa oleifera* L.) Dengan Metode Sokhletasi Menggunakan Pelarut N-Heksan, Metanol dan Etanol. ***Jurnal Teknotan,*** 2016, Vol 2(2), November 2016.
14. Tandi, J., Muthi'ah, H. Z., Yuliet, Y., & Yusriadi, Y. Efektivitas Ekstrak Daun Gedi Merah Terhadap Glukosa Darah, Malondialdehid, 8-Hdroksi-Deoksiguanosin, Insulin Tikus Diabetes. ***Journal Of Tropical Pharmacy And Chemistry***, 2016, *3*(4), 264-276.
15. Xiang X1, Wang Z, Zhu Y, Bian L, Yang Y. Dosage Of Streptozocin In Inducing Rat Model Of Type 2 Diabetes Mellitus. 2010, 39(2):138-42.
16. Stancáková, A. *Pathophysiology and Genetics of Impaired Insulin Secretion and Insulin Resistance*. 2010. Dissertations in Health Sciences. University of Eastern Finland.
17. Shulman G. I. Cellular mechanisms of insulin resistance. ***The Journal of clinical investigation,*** 2000, *106*(2), 171–176. https://doi.org/10.1172/JCI10583
18. Delarue, J. & Magnan, C. Free fatty acids and insulin resistance Free fatty acids and insulin resistance. 2007. pp.142–148.

19. Stanhope KL, Havel PJ. Fructose consumption: considerations for future research on its effects on adipose distribution, lipid metabolism, and insulin sensitivity in humans. ***The Journal of nutrition.*** 2009, 139(6):1236S-41S.
20. Basciano,H. F. L., and Adeli K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. ***Nutr & Metab,*** 2005, 2(5):1-14.
21. Goud, B.J., V, D., Swamy, B.K.C. Streptozotocin - A Diabetogenic Agent in Animal Models, ***International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Research (IJPPR)***, 2015, Vol 3 (1).
22. Soeroso, Admadi. Cytokines: Sitokin. ***Jurnal Oftalmologi Indonesia (JOI)***. 2007, Vol 5(3): 171-180.
23. Baratawidjaja G. K dan Rengganis Iris. *Imunologi Dasar*. Jakarta: Balai Penerbit FKUI. 2014.
24. Eleazu, C.O., Eleazu, K.C., Chukwuma, S., Essien, U.N. Reviem of the Mechanism of the Cell Death Resulting from Streptozotocin Challenge in Experimental Animals, its Practical Use and Potential Risk to Humans. ***Journal of Diabetes & Metabolic Disorders***, 2013, *12:60*, 2-7.
25. Hardianto, Eragraditya. Potensi Sri Biki Kedelai (*Glycine max*), Rimpang Jahe (*Zingiber officinale*) dan Kombinasinya Terhadap Kadar Superoxide Dismutase (SOD) dan Jumlah Nekrosis Sel Epitel Glomerulus Ginjal pada Tikus Model Diabetes Melitus. ***Jurnal Kedokteran Komunitas,*** 2018, 6(3): 286-293.
26. Todarwal A, Jain P, Bari S. Abelmoschus manihot Linn: ethnobotany, phytochemistry and pharmacology. ***Asian Journal of Traditional Medicines***. 2011, 20;4(1):21-5.
27. Dewantara, I. K. G. D., Gunawan, I. W. G., & Wirajana, I. N. Uji Potensi Ekstrak Etanol Daun Gedi (Abelmoschus Manihot L.) Terhadap Aktivitas Antioksidan Dan Penurunan Kadar Glukosa Darah Tikus Putih Galur Wistar Yang Diinduksi Aloksan. ***Cakra Kimia (Indonesian E-Journal Of Applied Chemistry),*** 2017, *5*(2), 94-101.
28. Skibola, Christine F and Martyn T Smith. Potential Health Impact of Excessive Flavonoid Intake. Elsevier. 2000, 29: 375-383.
29. Taroreh, Mercy & Widiyantoro, Ari & Murdiati, Agnes & Hastuti, Pudji & Raharjo, Sri. Identification of flavonoid from leaves of gedi (Abelmoschus manihot L.) and its antioxidant activity. 2016. Doi : https://doi.org/10.1063/1.4958518
30. Choy KW, Murugan DD, Leong XF, Abas R, Alias A. Flavonoids as natural anti-inflammatory agents targeting nuclear factor-kappa B (NFκB) signalling in cardiovascular diseases: A mini review**.** ***Frontiers in pharmacology***. 2019;10:1295.
31. Mattace, G., R., Meli, R., Di Carlo, G., Pacilio, M., Di Carlo, R. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A, ***Life Sciences,*** 2001, 68, 921–93.
32. Tandi J, As'ad S, Natzir R, Bukhari A. Test Of Ethanolextract Red Gedi Leaves (Albelmoschus Manihot.(L.) Medik) In White Rat (Rattus Norvegicus) Type 2 Diabetes Mellitus. ***International Journal Of Sciences***. 2016, 30(4):84-94.
33. Alhassan, A.J. Complication of Diabetes Mellitus: An Insight In To Biochemical Basis. ***European Journal of Pharmaceutical and Medical Research (EJPMR),*** 2019, *6*(2), 114-120.
34. Pan X, Du L, Tao J, et al. Dynamic changes of flavonoids in Abelmoschus manihot different organs at different growth periods by UPLC-MS/MS. ***Journal of chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences,*** 2017, 1059:21-26. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.05.020
35. Giri, B., Dey, S., Das, T., Sarkar, M., Banerjee, J., & Dash, S. K. Chronic hyperglycemia mediated physiological alteration and metabolic distortion leads to organ dysfunction, infection, cancer progression and other pathophysiological consequences: An update on glucose toxicity. ***Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie***, 2018, *107*, 306–328. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.157
36. Amorim, R. G., Guedes, G., Vasconcelos, S., & Santos, J. Kidney Disease in Diabetes Mellitus: Cross-Linking between Hyperglycemia, Redox Imbalance and Inflammation. ***Arquivos brasileiros de cardiologia***, 2019, *112*(5), 577–587. Doi: https://doi.org/10.5935/abc.20190077
37. Luis-Rodríguez, D., Martínez-Castelao, A., Górriz, J. L., De-Álvaro, F., & Navarro-González, J. F. Pathophysiological role and therapeutic implications of inflammation in diabetic nephropathy. ***World journal of diabetes,*** 2012, *3*(1), 7–18. doi:https://doi.org/10.4239/wjd.v3.i1.7
38. Fitriyah, N. Y. A. Efek Ekstrak Etanol Daun Gedi Merah *(Abelmoschus manihot* (L.)Medik) Terhadap Kadar TNF-Alfa Jaringan Dan Diameter Lumen Aorta Tikus Model Diabetes Melitus. 2020. (Unpublish).
39. Rahman I, Biswas SK, Kirkham PA. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochem Pharmacol*. 2006, 72(11):1439-1452. doi:https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.07.004
40. Sun L, Kanwar YS. Relevance of TNF-α in the context of other inflammatory cytokines in the

progression of diabetic nephropathy**.** ***Kidney Int***. 2015;88(4):662-665. doi: 10.1038/ki.2015.250

41. Arroyo, D. M.B. (2011). Metformin Associated Acute Kidney Injury and Lactic Acidosis. ***International Journal of Nephrology.*** Doi: 10.4061/2011/749653
42. Munawwaroh, Roudatul. Efek Dekokta Daun Pulutan (Urena lobata) Terhadap Kadar Superoxide Dismutase (SOD) dan Malondialdehyde (MDA) Hepar Ikan Zebra (Danio rerio) Yang Dipapar Malathion Secara Kronik. Jurnal Bio Komplementer Medicine, 2019, 6.3.