

EFEK EKSTRAK ETANOL DAUN GEDI MERAH (*Abelmoschus manihot* (L.) Medik) TERHADAP KADAR TNF-ALFA JANTUNG DAN NEKROSIS KARDIOMIOSIT TIKUS MODEL DIABETES MELITUS

Afifah Sakinah¹, Juliet Tangka², Sasi Purwanti¹, Yudi Purnomo^{1*}

¹Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

²Departemen 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 menyebabkan peningkatan risiko komplikasi kardiomiopati diabetik. Daun gedi merah (*Abelmoschus manihot* (L.) Medik) dikenal memiliki potensi antidiabetik, namun penelitian tentang efek daun gedi merah terhadap komplikasi kardiomiopati diabetik belum pernah dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek ekstrak etanol daun gedi merah terhadap kadar TNF- α jaringan jantung dan jumlah nekrosis kardiomiosit pada tikus Diabetes Mellitus (DM).

Metode: Tikus *sprague dawley* jantan usia 4-6 minggu dikelompokkan menjadi kelompok normal (KN), kelompok diabetes melitus (KDM) dan kelompok ekstrak etanol daun gedi merah (EEDGM) dosis I (200 mg/kgBB), II (400 mg/kgBB), dan III (800 mg/kgBB) (n=5 ekor). Tikus diinduksi DTLF dan STZ 25 mg/kgBB i.p *multiple dose*. EEDGM diberikan selama 4 minggu per oral. Kadar TNF- α diukur dengan *microplate reader* λ = 450 nm, sedangkan jumlah nekrosis kardiomiosit dengan pengecatan *Hematoxylin Eosin* diamati menggunakan mikroskop trinokuler perbesaran 400x. Analisa statistik menggunakan One Way ANOVA dilanjutkan dengan uji BNT ($p<0,05$).

Hasil: Pemberian EEDGM dengan dosis I, II, dan III secara signifikan menurunkan kadar TNF- α jantung berturut-turut sekitar 50%, 30%, dan 40% dibandingkan kelompok KDM ($p<0,05$), sedangkan jumlah nekrosis kardiomiosit menurun sekitar 40%, 20%, dan 30% ($p<0,05$). Pada kelompok KDM kadar TNF- α dan jumlah nekrosis kardiomiosit meningkat dibandingkan kelompok normal ($p<0,05$).

Kesimpulan: Pemberian EEDGM dapat menghambat peningkatan kadar TNF- α jantung dan jumlah nekrosis kardiomiosit pada tikus DM dengan efek terkuat pada dosis 200 mg/kgBB.

Kata Kunci : Gedi merah, DTLF, STZ, diabetes, TNF- α , nekrosis kardiomiosit.

EFFECT OF ETHANOL EXTRACT OF *Abelmoschus manihot* (L.) Medik ON TNF-ALFA HEART LEVELS AND TOTAL OF CARDIOMYOCYTE NECROSIS IN DIABETES MELLITUS RATS

ABSTRACT

Introduction : Chronic hyperglycemia causes an increased risk of cardiomyopathy diabetic complications. *Abelmoschus manihot* (L.) Medik are known to have antidiabetic potential, but research about the effects of red gedi on cardiomyopathy diabetic complication has never been studied. This research aims to determine the effects of ethanol extract red gedi leaves on TNF- α heart levels dan total of cardiomyocytes necrosis in diabetic rats.

Methods : This study use 4-6-weeks-old *Sprague dawley* male rats which grouped into normal group (KN), diabetes mellitus group (KDM), and ethanol extract of red gedi leaves doses I (200 mg/kgBW), II (400 mg/kgBW), and III (800 mg/kgBW) (n = 5 rats). The rats were induced by HFFD and 25 mg/kgBW of STZ injection intraperitoneally with multiple dose. The rats were administrated orally with ethanol extract of red gedi leaves for 4 weeks. TNF- α heart levels were measured using microplate reader λ = 450 nm, while the total necrosis of cardiomyocytes were observed by HE staining using a trinocular microscope at 400x magnification. Data were analyzed with one way ANOVA and continued by LSD test ($p < 0.05$).

Results : Ethanolic extract of red gedi leaves dose I, II, and III can decrease TNF- α heart level approximately 50%, 30%, and 40% compared to diabetic group ($p<0,05$), while the total of cardiomyocyte necrosis decrease approximately 40%, 20%, and 30% ($p<0,05$). In diabetic group, TNF- α heart level and the total of cardiomyocyte necrosis were increased compared to normal group ($p<0,05$).

Conclusion : Ethanolic extract of red gedi leaves can inhibit the increase of cardiac TNF- α levels dan the total of cardiomyocyte necrosis in diabetic rats with the most effective effect at the dose of 200 mg/kgBW.

Keywords : Red gedi, HFFD, STZ, diabetes, TNF- α , cardiomyocyte necrosis

PENDAHULUAN

Komplikasi kardiomiopati pada DM juga masih menjadi permasalahan di dunia. Kardiomiopati diabetik merupakan komplikasi diabetes mellitus yang ditandai dengan adanya perubahan struktur dan fungsi pada miokardium tanpa adanya faktor risiko seperti *coronary artery disease*, hipertensi, dan *valvular disease*¹. Pasien diabetes mellitus yang mengalami komplikasi kardiomiopati kurang lebih 12% dan meningkat sekitar 22% pada pasien yang berusia lebih dari 64 tahun².

Komplikasi kardimiopati diabetik disebabkan oleh kondisi stres oksidatif. Hiperglikemi pada DM menimbulkan peningkatan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) melalui jalur *polyol pathway*, *advanced glycation end products* (AGEs), aktivasi isoform protein kinase c dan *hexosamine pathway*³. Ketidakseimbangan antara peningkatan ROS dengan ketersediaan antioksidan menimbulkan kondisi stres oksidatif dan kerusakan jaringan⁴. Kerusakan oksidatif jaringan menimbulkan reaksi inflamasi melalui *over* stimulasi *Nuclear Factor kappa Beta* (NF- κ B) sehingga meningkatkan produksi sitokin proinflamasi seperti TNF- α ⁵. TNF- α adalah salah satu sitokin pleiotropik yang berpotensi dalam aktivasi sel *polymorphonuclear* (PMN) serta berperan dalam apoptosis sel, remodeling vaskular, dan menurunkan produksi *nitric oxide* (NO)^{6,7}. Ikatan TNF- α dengan reseptornya yaitu TNFR1 menimbulkan proses nekrosis pada kardiomiopati sehingga menimbulkan disfungsi organ jantung^{8,9}.

Daun gedi merah (*Abelmoschus manihot* (L.) Medik) merupakan tanaman yang memiliki khasiat obat. Berdasarkan data empiris, tanaman daun gedi merah sering digunakan masyarakat sebagai pengobatan alternatif untuk kencing manis, radang, dan hipertensi¹⁰. Hasil uji preklinik menunjukkan efek anti diabetes pada daun gedi merah terjadi melalui penghambatan enzim α glukosidase yang diprediksi diperankan oleh senyawa flavonoid¹¹. Senyawa flavonoid juga berperan sebagai anti DM melalui regenerasi kerusakan yang terjadi pada sel beta pankreas¹¹. Studi lain menunjukkan gedi merah juga mengandung senyawa tanin yang berperan untuk mengurangi penyerapan glukosa dengan mengerutkan epitel usus halus, sedangkan senyawa alkaloid berperan dalam merangsang sintesis glikogen dan menghambat sintesis glukosa^{12,13}. Hingga saat ini penelitian tentang efek ekstrak etanol daun gedi merah terhadap komplikasi kardiomiopati diabetik belum dilakukan.

METODE

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental 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 tahun 2020. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran

Universitas Brawijaya (FK UB), Laboratorium Patologi Anatomi FK UB, Laboratorium Farmakologi FK UB, dan Laboratorium Terpadu Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang (FK UNISMA).

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus galur *sparague dawley*. Usia tikus 4-6 minggu dengan berat badan sekitar 180-200 gram. Tikus dibagi menjadi 2 kelompok kontrol yang terdiri dari kelompok normal dan kelompok diabetes melitus, serta 3 kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol daun gedi merah (EEDGM).

Pembuatan Tikus Model Diabetes Melitus

Pembuatan tikus model DM menggunakan induksi diet tinggi lemak fruktosa (DTLF) dan induksi streptozotocin (STZ). DTLF terdiri dari kuning telur (4%), minyak kambing (6,5%), minyak babi (6,5%), asam kolat (0,2%), pakan ayam (82,8%), dan air secukupnya yang diberikan 25 gram/hari setiap sore selama 6 minggu¹⁴. Pemberian fruktosa 20% terdiri dari 200 ml fruktosa dicampur kedalam 1000 ml air yang diberikan 40ml/hari *ad libitum*. Induksi STZ dilakukan setelah memasuki minggu ke-4 pemberian DTLF, dengan dosis STZ sebanyak 25 mg/kgBB secara intraperitoneal *multiple dose*. Pengukuran kadar gula darah puasa dilakukan 72 jam pasca injeksi¹⁵. Tikus dinyatakan DM apabila kadar glukosa ≥ 126 mg/dl¹⁶.

Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Gedi Merah

Serbuk daun gedi merah (*Abelmoschus manihot* (L.) Medik) diperoleh dari Balai Materia Medika, Batu, Jawa Timur, dengan surat keterangan determinasi nomer 074/193A /102.7/2020. Dosis ekstrak etanol daun gedi merah yang digunakan adalah 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB, dan 800 mg/kgBB¹². Ekstraksi daun gedi merah menggunakan metode soxhletasi. Serbuk daun gedi merah ditimbang sebanyak 25 gram dalam 250 ml etanol 96%. Setelah itu, dilakukan pemanasan pada pelarut sesuai titik didih dan ekstraksi dihentikan apabila pelarut berwarna jernih. Hasil ekstrak dihilangkan pelarutnya dengan *rotary evaporator* untuk mendapatkan bentuk pasta. Ekstrak disuspensi dengan CMC-Na 0,1% sebelum disondekan dalam tiga dosis⁵².

Pengorbanan dan Pengambilan Sampel Hewan Coba

Hewan coba dikorbankan dengan pemberian injeksi ketamin 0,2 ml intramuskular. Kemudian tikus dibedah secara vertikal mengikuti linea media dari arah abdomen menuju thorax hingga seluruh abdomen dan thorax terbuka. Kemudian dilakukan pengambilan organ jantung lalu dibilas dengan larutan fisiologis *Natrium Chloride* (NaCl) sebanyak 3 kali dan dilanjutkan dengan pembilasan menggunakan larutan *Phosphate Buffer Saline* (PBS). Organ jantung yang akan diamati disimpan di tempat penyimpanan.

Pengukuran kadar TNF- α jaringan

100 μ l Standart Working Solution ditambahkan pada well di 2 kolom pertama. Kemudian 100 μ l supernatan ditambahkan pada well yang tersisa kemudian diinkubasi pada 37°C selama 90 menit. Setelah itu 100 μ l *Biotinylated Detection Ab working solution* ditambahkan pada setiap well dan diinkubasi pada 37°C selama 1 jam. Aspirasi dan cuci menggunakan 350 μ l *Wash buffer* dan ditambahkan 100 μ l HRP Conjugate untuk masing-masing well. Kemudian well diinkubasi pada 37°C selama 30 menit. Lakukan aspirasi dan cuci menggunakan 350 μ l *Wash buffer* kemudian tambahkan 90 μ l substrat reagent pada ruangan yang gelap. Kemudian well diinkubasi pada 37°C selama 15 menit lalu 50 μ l *stop solution* ditambahkan pada well dan tentukan nilai OD pada panjang gelombang 450 nm dan hasil dinyatakan dalam satuan pg/mL⁴⁵.

Pengukuran Jumlah Nekrosis Kardiomiosit

Organ jantung bagian ventrikel dimasukan ke botol flakon kemudian direndam kedalam larutan fiksatif formalin 10 %. Jantung dipotong (*trimming*) kurang lebih 2-3 mm dan diproses dengan alat *automatic tissue tex prosesor* selama 90 menit

dengan teknik *dehydration* untuk mengeluarkan cairan dalam jaringan agar dapat diisi dengan parafin. Selanjutnya dilakukan *clearing* dengan xylol dilanjutkan dengan *infiltration* dengan parafin, kemudian jaringan diangkat dari mesin *tissue prosesor* dan dilakukan blok parafin. Blok parafin jaringan dipotong dengan alat microtome ketebalan 3-5 mikron dan dilakukan proses pewarnaan *Hematoxylin-Eosin* (HE) dilanjutkan pengamatan menggunakan mikroskop trinokuler perbesaran 400x. Kemudian dihitung jumlah kardiomiosit yang mengalami piknotik, karioreksis dan kariolisis pada 10 lapang pandang (LP) untuk setiap preparat dan diambil rataannya³⁹.

Analisa Statistik

Data yang diperoleh dianalisa dengan uji normalitas dan homogenitas. Apabila data dinyatakan terdistribusi normal maka dilakukan uji beda menggunakan metode statistik parametrik yaitu *one way ANOVA* dan dilanjutkan uji *least significance different* (LSD). Hasil dinyatakan bermakna apabila nilai $p < 0,05$. Analisa data dilakukan menggunakan software statistik SPSS.

HASIL DAN ANALISA DATA

Karakteristik Sampel

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

Tabel 1. Karakteristik sampel

n=5	KN	KDM	EEDGM 200 mg/KGBB	EEDGM 400 mg/KGBB	EEDGM 800 mg/KGBB
BB pra perlakuan (g)	242.8 $\pm$ 12.7 ^a	230.4 $\pm$ 11.5 ^a	246.8 $\pm$ 18.9 ^a	256.2 $\pm$ 32.20 ^a	253.0 $\pm$ 25.08 ^a
BB pasca perlakuan (g)	335.4 $\pm$ 34.9 ^a	279.2 $\pm$ 54.0 ^b	304.80 $\pm$ 52.0 ^c	324.8 $\pm$ 24.1 ^c	333.6 $\pm$ 29.8 ^a
Δ BB (g)	92,6 $\pm$ 27,6	48,8 $\pm$ 44,5	58.0 $\pm$ 48,9	68,6 $\pm$ 33,2	80,6 $\pm$ 10,7
Asupan Pakan (%)	89.6 $\pm$ 9.6 ^a	84,8 $\pm$ 7,7 ^a	77,6 $\pm$ 15,1 ^a	86,4 $\pm$ 9,21 ^a	81,6 $\pm$ 12,2 ^a
KGDP awal (mg/dL)	74.6 $\pm$ 3.0 ^a	85.0 $\pm$ 8.5 ^b	83.2 $\pm$ 5.3 ^b	87.6 $\pm$ 3.9 ^b	81.6 $\pm$ 3.2 ^b
KGDP pra perlakuan (mg/dL)	100.0 $\pm$ 7.9 ^a	182.6 $\pm$ 43.1 ^b	171.6 $\pm$ 11.6 ^b	172.2 $\pm$ 26.6 ^b	163.6 $\pm$ 9.9 ^b
KGDP pasca perlakuan (mg/dL)	111.6 $\pm$ 5.9 ^a	149.8 $\pm$ 11.1 ^b	130.6 $\pm$ 4.8 ^c	120.8 $\pm$ 11.4 ^d	113.8 $\pm$ 5.7 ^a

Keterangan:

Data tabel 1 merupakan data kelompok

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

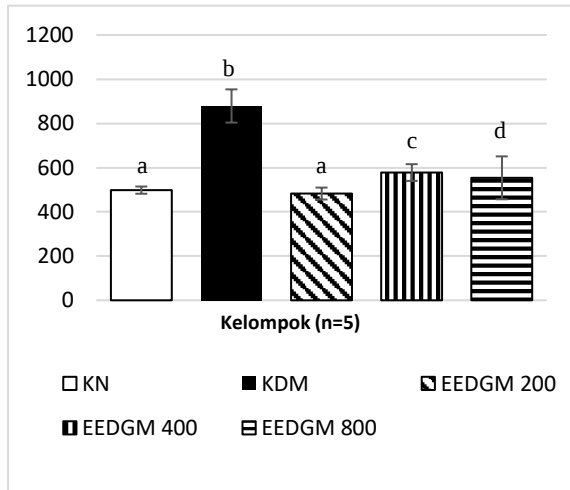
BB pra perlakuan: sebelum induksi DM, BB pasca perlakuan: setelah induksi DM dan EEDGM KGDP Awal: sebelum induksi DM dan EEDGM, KGDP pra perlakuan: setelah induksi STZ, KGDP pasca perlakuan: setelah diberi EEDGM.

Berdasarkan tabel 1, berat badan pra perlakuan relatif tidak berbeda antar kelompok ($p > 0,05$). Berat badan pasca perlakuan cenderung lebih meningkat pada semua kelompok dibandingkan berat badan pra perlakuan. Kelompok EEDGM menunjukkan berat badan yang lebih tinggi dibandingkan KDM ($p < 0,05$). Berat badan pada kelompok normal lebih besar dibandingkan KDM ($p < 0,05$).

Asupan pakan terendah terdapat pada kelompok EEDGM 200 mg/kgBB dan tertinggi pada kelompok KN. KGDP pra perlakuan cenderung meningkat pada kelompok DM dan perlakuan setelah induksi DM ($p > 0,05$). KGDP pasca perlakuan pada kelompok EEDGM lebih kecil dibandingkan kelompok KDM ($p < 0,05$). KGDP pasca perlakuan pada kelompok KDM lebih tinggi dibandingkan KN ($p < 0,05$).

Kadar TNF- α Jaringan Jantung Tikus Model Diabetes Mellitus

Efek ekstrak etanol daun gedi merah (*Abelmoschus manihot* (L.) Medik) terhadap kadar TNF- α jaringan jantung tikus model Diabetes dapat dilihat pada **gambar 1**.



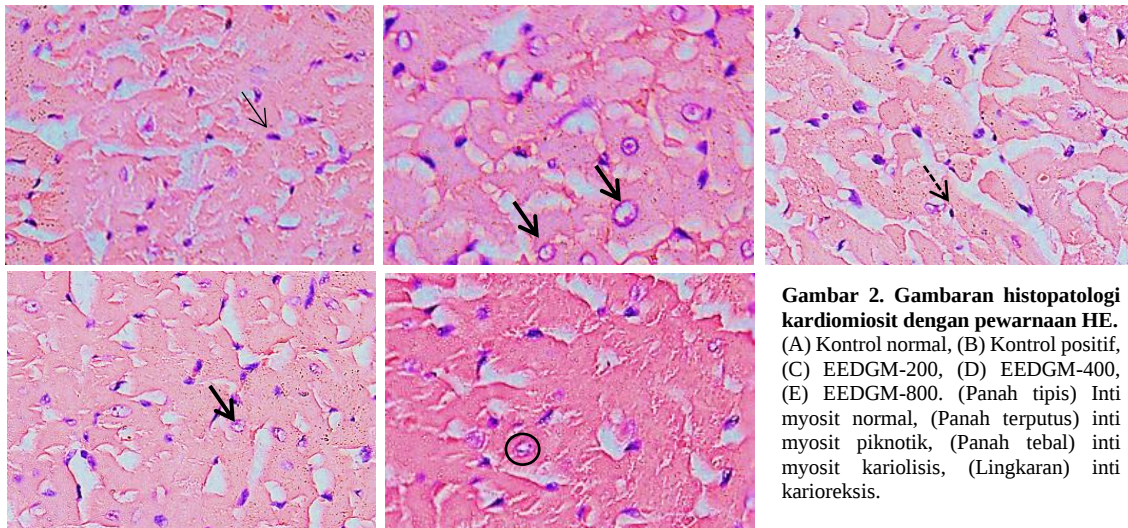
Keterangan : *a,b,c,...= huruf berbeda menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$, LSD)

Gambar 1. Histogram kadar TNF- α jaringan jantung tikus model diabetes melitus yang telah diberikan ekstrak etanol daun gedi merah

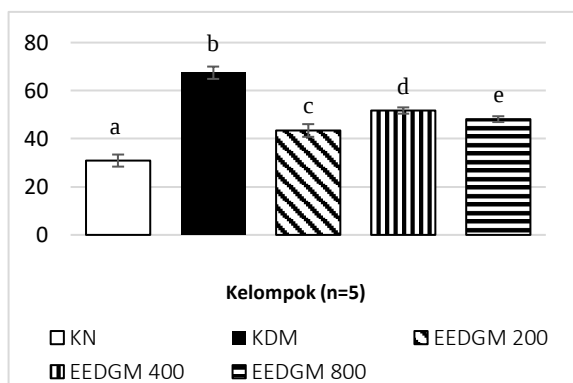
Induksi DM pada tikus dengan pemberian DTLF dan STZ meningkatkan kadar TNF- α secara signifikan sekitar 80% dibandingkan dengan kelompok kontrol normal ($p < 0,05$). Pemberian EEDGM dengan dosis 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB, dan 800 mg/kgBB secara signifikan menurunkan TNF- α jantung tikus model DM berturut-turut sekitar 50%, 30% dan 40% dibandingkan KDM ($p < 0,05$). Pemberian EEDGM berbeda signifikan antar dosis dalam menurunkan kadar TNF- α dengan efek terkuat pada dosis 200 mg/kgBB ($p < 0,05$). Pemberian dosis 200 mg/kgBB dapat menghambat peningkatan TNF- α hingga tak berbeda signifikan dengan kelompok normal ($p > 0,05$), sedangkan pada kelompok EEDGM 400 mg/kgBB dan 800 mg/kgBB lebih tinggi dibandingkan kelompok normal ($p < 0,05$).

Jumlah Nekrosis Kardiomyosit Jantung Tikus Model Diabetes Mellitus

Efek pemberian ekstrak etanol daun gedi merah (*Abelmoschus manihot* (L.) Medik) terhadap jumlah nekrosis kardiomyosit (/LP) tikus model diabetes melitus dapat dilihat pada **gambar 2** dan **gambar 3**.



Gambar 2. Gambaran histopatologi kardiomyosit dengan pewarnaan HE. (A) Kontrol normal, (B) Kontrol positif, (C) EEDGM-200, (D) EEDGM-400, (E) EEDGM-800. (Panah tipis) Inti myosit normal, (Panah terputus) inti myosit piknotik, (Panah tebal) inti myosit kariolisis, (Lingkaran) inti karioreksis.



Keterangan : *a,b,c,...= huruf berbeda menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$, LSD)

Gambar 3. Histogram jumlah nekrosis kardiomyosit tikus model diabetes melitus yang telah diberikan ekstrak etanol daun gedi merah.

Induksi DM dengan pemberian DTLF dan STZ meningkatkan secara signifikan jumlah nekrosis kardiomyosit sekitar 2 kali lipat dibandingkan kontrol normal ($p < 0,05$). Pemberian EEDGM dosis 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB, dan 800 mg/kg BB berbeda signifikan menurunkan jumlah nekrosis kardiomyosit berturut-turut 40%, 20%, dan 30% dibandingkan KDM ($p < 0,05$). Pemberian EEDGM berbeda signifikan antar dosis dalam menurunkan jumlah nekrosis kardiomyosit dengan efek terkuat pada dosis 200 mg/kgBB ($p < 0,05$). Jumlah nekrosis kardiomyosit pada kelompok EEDGM lebih tinggi sekitar 40%-70% dibandingkan kelompok normal ($p < 0,05$).

Korelasi Kadar TNF- α Jantung dengan Jumlah Nekrosis Kardiomyosit Tikus Model Diabetes Mellitus

Hasil uji korelasi *Pearson* antara kadar TNF- α jantung dengan jumlah nekrosis kardiomyosit dapat dilihat pada **tabel 2**.

Tabel 2. Uji Korelasi TNF- α Jantung dengan Jumlah Nekrosis Kardiomyosit

Correlations		TNF-Alpha	Nekrosis Kardiomyosit
TNF-Alpha	Pearson Correlation	1	,835**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	25	25
Nekrosis Kardiomyosit	Pearson Correlation	,835**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	25	25

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Hubungan antara TNF- α jantung dengan jumlah nekrosis kardiomyosit signifikan ($p < 0,05$) dengan nilai koefisien korelasi sebesar 0,835 yang menunjukkan memiliki hubungan kuat.

PEMBAHASAN

Karakteristik Sampel

Penelitian ini menggunakan tikus galur *Sprague dawley* jantan berusia 4-6 minggu dengan berat badan 180-200 gram. Pemilihan galur *Sprague dawley* sebagai hewan uji karena memiliki temperamen yang baik sehingga cukup tahan terhadap perlakuan⁴⁶. Selain itu, tikus *Sprague dawley* memiliki karakteristik fisiologi yang mirip dengan manusia dibandingkan kelinci⁴⁷. Tikus jantan digunakan sebagai hewan uji karena tidak berpengaruh terhadap hormon⁴⁸.

Berat badan kelompok EEDGM pasca perlakuan menunjukkan nilai yang lebih tinggi dibandingkan kelompok KDM. Peningkatan berat badan tersebut diduga karena adanya aktivitas senyawa flavonoid dan saponin pada ekstrak etanol daun gedi merah. Senyawa flavonoid berperan dalam peningkatan berat badan dengan cara meningkatkan sensitivitas insulin melalui penetralan radikal bebas, sedangkan saponin berperan dalam stimulasi pelepasan insulin. Peningkatan stimulasi pelepasan insulin dan sensitivitas insulin meningkatkan pemasukan glukosa ke dalam sel. Hal tersebut menyebabkan penghambatan pada lipolisis sehingga berat badan tidak menurun^{24,40}.

Sedangkan pada kelompok KDM pasca perlakuan memiliki berat badan yang lebih rendah secara signifikan dibandingkan kelompok KN. Berat badan yang rendah pada kelompok DM disebabkan oleh induksi DTLF dan STZ yang berperan dalam resistensi insulin dan penurunan sekresi insulin^{17,18,19}. Resistensi dan penurunan sekresi insulin menyebabkan terjadinya peningkatan lipolisis sehingga terjadi penurunan berat badan kelompok KDM⁴⁹. Pada hasil pengukuran asupan pakan didapatkan penurunan nafsu makan pada KDM dibandingkan kelompok KN. Hal tersebut diduga karena gangguan saluran cerna pada kondisi DM yang menyebabkan gangguan pengosongan

lambung atau *delayed gastric emptying* (gastroparesis) yang menimbulkan rasa kenyang sehingga terjadi penurunan asupan pakan⁵¹.

Kadar gula darah puasa (KGDP) kelompok KDM memiliki nilai lebih tinggi dibandingkan kelompok KN pasca perlakuan. Peningkatan KGDP disebabkan karena induksi DTLF dan STZ yang menimbulkan resistensi insulin serta penurunan sekresi insulin sehingga terjadi hiperglikemia^{17,18,19}. Sedangkan KGDP pada kelompok EEDGM pasca perlakuan menunjukkan penurunan dibandingkan kelompok KDM. Hal tersebut disebabkan karena adanya senyawa aktif seperti flavonoid dan saponin pada daun gedi merah, yang berperan sebagai antidiabetik. Flavonoid berperan dalam peningkatan sensitivitas insulin, sedangkan saponin berperan dalam stimulasi pengeluaran insulin yang menyebabkan penurunan kadar glukosa^{24,40}.

Efek Induksi DTLF dan STZ terhadap Kadar TNF- α Jantung dan Jumlah Nekrosis Kardiomyosit Tikus Model Diabetes Mellitus

Induksi DTLF dan STZ dapat meningkatkan kadar TNF- α jantung dan jumlah nekrosis kardiomyosit. Peningkatan tersebut terjadi karena adanya kondisi stres oksidatif akibat hiperglikemia melalui resistensi insulin yang disebabkan oleh induksi DTLF dan kerusakan sel β pankreas oleh STZ.

Diet tinggi lemak dapat meningkatkan *Free Fatty Acid* (FFA) yang berperan dalam peningkatan *diacylglycerol* (DAG) dan Protein Kinase C (PKC). PKC merupakan enzim yang berperan dalam fosforilasi serin pada *Insulin Receptor Substrat* (IRS-1). Fosforilasi serin pada IRS-1 menyebabkan terjadinya resistensi insulin yang berlanjut pada kondisi hiperglikemia¹⁷.

Diet tinggi fruktosa memicu metabolisme fruktosa oleh hepar. Molekul fruktosa akan diserap melalui glukosa transporter 5 (GLUT5) dan dikeluarkan menuju aliran darah. Fruktosa akan masuk ke dalam hepatosit melalui GLUT2 dan diubah menjadi fruktosa 1-fosfat oleh enzim fruktokinase. Fruktosa 1-fosfat kemudian diubah menjadi triose fosfat oleh enzim aldolase B. Peningkatan triose fosfat memicu terjadinya sintesis glikogen dan asam lemak dari karbon fruktosa melalui jalur *de novo lipogenesis*. Pembentukan asam lemak yang tinggi menyebabkan penurunan sensitivitas insulin sehingga ambilan glukosa menurun. Hal tersebut memicu proses lipolisis yang menyebabkan peningkatan FFA sehingga terjadi resistensi insulin dan berlanjut pada kondisi hiperglikemia¹⁸.

Induksi streptozotocin (STZ) menyebabkan hiperglikemia melalui kerusakan pada sel β pankreas sehingga menurunkan produksi insulin. STZ memasuki sel β melalui GLUT2 dan menyebabkan alkilasi DNA. Kerusakan pada DNA memicu aktivasi *poly ADP-ribosylation* yang menyebabkan deplesi pada NAD⁺ dan ATP seluler. Peningkatan defosforilasi ATP menimbulkan pembentukan substrat untuk *xanthine oxidase* yang

memicu pembentukan radikal *superoxide*. Selain itu, STZ juga membebaskan sejumlah nitrit oksida toksik yang menghambat aktivitas aconitase dan berperan dalam kerusakan DNA. Hal tersebut menyebabkan terjadinya nekrosis pada sel β pankreas³².

Kondisi hiperglikemia kronis akibat induksi DTLF dan STZ menyebabkan peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) sehingga terjadi kondisi stres oksidatif. Kondisi stres oksidatif dapat menimbulkan kerusakan oksidatif sehingga memicu reaksi inflamasi melalui aktivasi NF- κ B yang meningkatkan sitokin proinflamasi seperti TNF- α ⁵. TNF- α merupakan sitokin proinflamasi yang diekspresikan oleh aktivasi sel-sel radang seperti makrofag dan limfosit. TNF- α mentransmisikan sinyal melalui TNF reseptor 1 (TNFR1) pada kardiomyosit. TNF- α berikatan dengan TNFR1 menyebabkan nekrosis kardiomyosit melalui inhibisi *caspase-8* dan stabilisasi *receptor interacting protein 1* (RIP1)^{21,8}. *Death domain* (DD) pada RIP1 mengikat TNF-receptor associated death domain (TRADD) dan Fas associated via death domain (FADD) yang menyebabkan peningkatan metabolisme melalui glikolisis dan glutaminolisis. Hal tersebut memicu fosforilasi oksidatif yang meningkatkan produksi ROS sehingga terjadi nekrosis kardiomyosit³⁶.

Stres oksidatif yang disebabkan oleh ROS dapat menyebabkan nekrosis kardiomyosit secara langsung melalui jalur *RIP-mediated necrosis* dan jalur *mitochondrial necrosis*. Peningkatan produksi ROS pada mitokondria memicu nekrosis kardiomyosit yang menyebabkan kerusakan miokardium. ROS juga meningkatkan protein RIP1 dan RIP3 sehingga memicu nekrosis kardiomyosit yang diinduksi H₂O₂⁴³.

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

Pemberian ekstrak etanol daun gedi merah (EEDGM) dapat menghambat peningkatan TNF- α jantung pada tikus DM. Hal tersebut disebabkan karena daun gedi merah memiliki senyawa yang berpotensi sebagai antiinflamasi, antioksidan dan antidiabetik¹⁰.

Daun gedi merah memiliki efek antiinflamasi yang secara langsung mencegah peningkatan kadar TNF- α jantung yang diperankan oleh flavonoid. Flavonoid dapat menghambat pelepasan mediator inflamasi dan metabolisme asam arakidonat melalui inhibisi enzim siklooksigenase-2 (COX-2) dan 5-lipooksigenase (5-LOX)²⁷. Penghambatan enzim 5-LOX akan mengurangi produksi beberapa sitokin inflamasi salah satunya TNF- α ³⁸. Selain itu, flavonoid memiliki kemampuan untuk menghambat produksi sitokin proinflamasi seperti TNF- α melalui inhibisi NF- κ B^{27,34}. Quercetin merupakan salah satu jenis flavonoid yang memiliki aktivitas antiinflamasi dengan memodulasi produksi dari sitokin proinflamasi TNF- α ²⁸.

Efek antioksidan pada daun gedi merah merupakan efek tidak langsung terhadap penurunan kadar TNF- α jantung yang diperantarai senyawa flavonoid dan alkaloid. Senyawa flavonoid dapat mencegah *injury* yang disebabkan oleh radikal bebas. Flavonoid menghambat stres oksidatif melalui reaksi dengan radikal bebas sehingga menghasilkan radikal yang lebih stabil. Gugus hidroksil dari flavonoid memiliki reaktivitas yang tinggi sehingga dapat menginaktivasi radikal²⁵. Sementara senyawa alkaloid memiliki potensi sebagai antioksidan primer dengan cara mendonorkan atom H pada radikal bebas²⁶.

Daun gedi merah sebagai antidiabetik merupakan mekanisme secara tidak langsung dalam menghambat peningkatan kadar TNF- α melalui kandungan senyawa berupa flavonoid, alkaloid, saponin dan tanin sebagai antidiabetik¹³. Flavonoid dalam daun gedi merah berperan dalam mencegah rusaknya sel β pankreas serta menetralkan radikal bebas yang dapat meningkatkan sensitifitas insulin⁴⁰. Flavonoid juga berperan dalam menghambat enzim α glukosidase sehingga dapat menurunkan glukosa darah¹¹. Senyawa alkaloid sebagai antidiabetik berperan dalam menghambat absorpsi glukosa di usus, meningkatkan transportasi glukosa dalam darah serta memicu sintesis glikogen²². Senyawa saponin dalam daun gedi merah juga memiliki aktivitas antidiabetes melalui inhibisi enzim α glukosidase pada usus yang berperan untuk menurunkan kadar glukosa darah dengan menghambat pengubahan disakarida menjadi glukosa²³. Selain itu, senyawa saponin juga memiliki aktivitas menstimulasi pelepasan insulin²⁴. Sedangkan senyawa tanin pada daun gedi merah berperan dalam pengerutan membran epitel usus yang mengurangi penyerapan glukosa sehingga kadar glukosa darah berkurang¹².

Pada penelitian ini didapatkan perbedaan signifikan antar dosis EEDGM dalam menghambat peningkatan TNF- α dengan efek terkuat pada dosis I. Pemberian EEDGM dosis I menghambat peningkatan kadar TNF- α lebih tinggi dibandingkan dosis II dan III. Hal ini diduga karena adanya kandungan flavonoid yang berlebihan. Kandungan flavonoid berlebihan dapat bertindak sebagai pro-oksidan yang memicu peningkatan radikal bebas sehingga efektivitas dalam mencegah peningkatan kadar TNF- α berkurang³⁵. Pada penelitian ini didapatkan kesan *non-dependent dose* karena tidak adanya peningkatan efektivitas yang menyertai peningkatan dosis. Hal ini diduga karena terdapat senyawa multikomponen pada daun gedi merah yang memiliki berbagai mekanisme sehingga efektivitas dalam menurunkan jumlah nekrosis kardiomyosit berkurang.

TNF- α merupakan sitokin yang berperan dalam proses inflamasi, imunitas dan apoptosis. TNF- α diekspresikan oleh aktivasi sel-sel radang seperti makrofag dan limfosit. TNF- α mentransmisikan sinyal melalui dua reseptor, yaitu TNF reseptor 1 (TNFR1) dan TNF reseptor 2 (TNFR2). TNFR1 berperan hampir pada seluruh tipe sel, sedangkan

ekspresi TNFR2 terdapat pada sel endotel dan hematopoiesis^{41,42}.

Efek Ekstrak Etanol Daun Gedi Merah Terhadap Jumlah Nekrosis Kardiomyosit Tikus Model Diabetes Melitus.

Pemberian ekstrak etanol daun gedi merah menghambat peningkatan jumlah nekrosis kardiomyosit pada tikus DM. Hal tersebut disebabkan karena adanya senyawa pada daun gedi merah yang memiliki aktivitas antiinflamasi, antioksidan, dan antidiabetes²⁹.

Efek antiinflamasi daun gedi merah merupakan efek secara langsung terhadap penurunan jumlah nekrosis kardiomyosit melalui senyawa flavonoid. Flavonoid mampu mengurangi ekspresi berbagai sitokin proinflamasi termasuk TNF- α ³⁰. Pengurangan ekspresi gene TNF- α diperankan oleh salah satu jenis flavonoid yaitu quercetin melalui penekanan aktivitas NF- κ B²⁸. Peningkatan jumlah nekrosis kardiomyosit dapat dihambat melalui penurunan TNF- α sehingga tidak berikatan dengan TNFR1 yang menghambat nekrosis pada kardiomyosit. Penghambatan ekspresi sitokin dan molekul adhesi memberikan kemungkinan bahwa flavonoid memiliki mekanisme yang menyediakan efek kardio-protektif pada manusia³¹.

Sedangkan efek antioksidan pada daun gedi merah secara tidak langsung berperan dalam menghambat peningkatan jumlah nekrosis kardiomyosit. Efek antioksidan pada daun gedi merah diperankan oleh senyawa flavonoid dan alkaloid dengan menetralkan radikal bebas melalui oksidasi oleh radikal tersebut sebagaimana yang telah dijelaskan sebelumnya²⁵. Penetralkan radikal bebas akan mengurangi reaksi inflamasi yang dapat mencegah peningkatan sitokin proinflamasi TNF- α sehingga mencegah peningkatan jumlah nekrosis kardiomyosit. Flavonoid juga dapat mengurangi pembentukan ROS pada mitokondria sehingga dapat mencegah peningkatan nekrosis kardiomyosit^{43,44}.

Daun gedi merah sebagai antidiabetik merupakan mekanisme secara tidak langsung dalam menghambat peningkatan jumlah nekrosis kardiomyosit. Efek antidiabetik daun gedi merah diperantarai oleh senyawa flavonoid, alkaloid, saponin dan tanin dengan mekanisme yang sudah dijelaskan sebelumnya¹³. Penghambatan hiperglikemia oleh senyawa-senyawa tersebut dapat mencegah stres oksidatif dan kerusakan oksidatif sehingga dapat mencegah peningkatan jumlah nekrosis kardiomyosit yang disebabkan oleh peningkatan TNF- α .

Pemberian EEDGM dosis I dapat menghambat peningkatan jumlah nekrosis kardiomyosit lebih tinggi dibandingkan EEDGM dosis II dan III. Kondisi ini diduga disebabkan karena senyawa flavonoid pada daun gedi merah mengalami autooksidasi sehingga terbentuk hidrogen peroksida, superoksida dan hidroksil radikal³³. Hal ini didukung oleh penelitian yang dilakukan Fuadi tahun 2020 (*unpublish*) yang meneliti tentang efek EEDGM terhadap MDA (*Malondialdehyd*) ginjal tikus DM

yang mengalami peningkatan pada dosis 800 mg/kgBB. Peningkatan MDA menunjukkan terjadinya peningkatan radikal bebas yang memicu peningkatan jumlah nekrosis kardiomyosit⁵⁰. Selain itu hal tersebut juga bisa disebabkan karena kandungan multikomponen pada gedi merah sehingga tidak terjadi peningkatan efek pada dosis dengan tingkatan berbeda.

Kerusakan berupa nekrosis pada kardiomyosit disebabkan oleh aktivitas sitokin proinflamasi yaitu TNF- α . Nekrosis kardiomyosit ditandai dengan adanya perubahan inti berupa piknosis, karioreksis dan kariolisis. Piknosis berupa inti yang mengecil dengan peningkatan warna basofil. Gambaran karioreksis berupa inti piknotik yang mengalami fragmentasi, sedangkan pada gambaran kariolisis warna basofil dan kromatin akan memudar³⁷.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian dan pembahasan di atas maka dapat ditarik kesimpulan bahwa induksi DTLF dan STZ dapat meningkatkan kadar TNF- α dan jumlah nekrosis kardiomyosit. Sementara EEDGM dosis 200 mg/kgBB merupakan dosis dengan efek paling kuat dalam menghambat peningkatan kadar TNF- α dan jumlah nekrosis kardiomyosit.

SARAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disarankan bahwa :

1. Melakukan penelitian mengenai mekanisme kerja senyawa-senyawa aktif pada daun gedi merah secara *in silico*
2. Melakukan penelitian mengenai indeks resistensi insulin
3. Melakukan penelitian dengan variasi dosis dan waktu yang berbeda

UCAPAN TERIMA KASIH

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

DAFTAR PUSTAKA

1. Jia G, Michael A, & J G Sowers. Diabetic Cardiomyopathy: an update of mechanism contributing to this clinical entity. *Circulation Research*. 2018. 122:624-638
2. Lorenzo-Almoroz, A., et al. Diagnostic approaches for diabetic cardiomyopathy. *Cardiovascular Diabetology*. 2017. 16.1: 1-14
3. Giacco, F & M, Brownlee. Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation Research*. 2010. 107(9): 1058-1070
4. Ahmed R G, A F Azmy, S Incerpi & A Gaber. The Developmental and Physiological Interaction between Free Radical and Antioxidant Defense System: Effect of Environmental

- Pollutants. *Journal of Natural Science Research*. 2013. 3(13):74-110
5. Nunes S, Soares E, Periera F & Reis F. The Role of Inflammation in Diabetic Cardiomyopathy. *International Journal of Interferon, Citokine and Mediator Research*. 2012. 4:59-73
 6. Supit I A, D H C Pengemanan & Sylvia R M. Profil Tumor Necrosis Factor (TNF- α) Berdasarkan Indeks Massa Tubuh (IMT) pada Mahasiswa Fakultas Kedokteran UNSRAT Angkatan 2014. *Journal e-Biomedik*. 2015. 3(2):640-643
 7. Zhang, et al. Role of TNF- α in vascular dysfunction. *Clin Sci*. 2009. 116(3):219-230
 8. Chu WM. Tumor Necrosis Factor. *Cancer Lett*. 2013. 328(2):222-225
 9. Chiong M, Wang ZV, Pedrozo Z, et al. 2011. Cardiomyocyte death: mechanisms and translational implications. *Cell Death Dis*. 2011. 2(12):e224
 10. Nurjannah. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Gedi Merah (*Abelmoschus manihot* L) Terhadap Penurunan Tekanan Darah Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Prednison dan Garam. [Skripsi]. 2016. Universitas Islam Negeri Alauddin, Makassar.
 11. Dewantara I K G, I Wayan G G & I N Wirajana. 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*. 2017.5(2):94-101
 12. Tandi J, Muthi'ah H Z, Yuliet & Yusriadi. Efektivitas Daun Gedi Merah Terhadap Glukosa Darah, Malondialdehid, 8-Hidroksi-Deoksiguanosin, Insulin Tikus Diabetes. *J. Trop. Pharm. Chem*. 2016. 3(4):264-276
 13. Mercedes, Agustina. Aktivitas Antidiabetes Kombinasi Ekstrak Daun Gedi Merah dan Daun Semak Bunga Putih Tikus Induksi Streptozotocin. *Jurnal Farmasi*. 2017. 14(2):159-166
 14. Murwani S, Ali M, Muliarta K. Diet aterogenik pada tikus putih (*Rattus norvegicus* strain Wistar) sebagai model hewan aterosklerosis. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 2013 Apr 18;22(1):6-9.
 15. Mansor, L.S., Gonzalez, E.R., Cole, M.A. *et al*. Cardiac metabolism in new rat model of type 2 diabetes using high-fat diet with low dose streptozotocin. *Cardiovasc Diabetol*. 2013. 12, 136
 16. Firdaus, F., Rimbawan, R., Marliyati, S. A., & Roosita, K. 2016. Model Tikus Diabetes yang Diinduksi Streptocotozin-Sukrosa untuk Pendekatan Penelitian Diabetes Mellitus Gestasional. *Media Kesehatan Masyarakat Indonesia*, 12(1), 29-34.
 17. Boden, G & M, Laakso. 2004. Lipids and Gucose in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2004. 27(9): 2253-2259
 18. Wulansari, D. D., & Wulandari, D. D. Pengembangan Model Hewan Coba Tikus Diabetes Mellitus Tipe 2 dengan Induksi Diet Tinggi Fruktosa Intragastrik. *Media Pharmaceutica Indonesiana (MPI)*. 2018. 2(1), 41-47
 19. Graham, M. L., Janecek, J. L., Kittredge, J. A., Hering, B. J., & Schuurman, H. J. The streptozotocin-induced diabetic nude mouse model: differences between animals from different sources. *Comparative medicine*. 2011. 61(4), 356–360.
 20. Deeds, M. C., Anderson, J. M., Armstrong, A. S., Gastineau, D. A., Hiddinga, H. J., Jahangir, A., Eberhardt, N. L., & Kudva, Y. C. Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. *Laboratory animals*. 2011.45(3), 131–140.
 21. Morgan, M. J., Kim, Y. S., & Liu, Z. G. 2008. TNF α and reactive oxygen species in necrotic cell death. *Cell research*, 18(3), 343-349.
 22. Arjadi, F., & Susatyo, P. Regenerasi sel pulau langerhans pada tikus putih (*rattus norvegicus*) diabetes yang diberi rebusan daging mahkota (*phaleria macrocarp lam*). *Sains Medika*. 2010. 2(2), 117-126.
 23. Fiana, N., & Oktaria, D. Pengaruh kandungan saponin dalam daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap penurunan kadar glukosa darah. *Jurnal Majority*. 2016. 5(4), 128-132.
 24. Firdaus, M. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Gedi merah (*Abelmoschus manihot* L. Medik) terhadap Radikal Bebas DPPH dan Aktivitas Enzim Glutation Peroksidase pada Tikus Diabetes. 2018. Doctoral disertation, Universitas Setia Budi Surakarta.
 25. Panche, A., Diwan, A, D., Chandra, S. R. Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 2016,5.
 26. Kurniati, Ruth Indah, et al. Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etanol Daun Buas-Buas (*Premna cordifolia* Linn.) dengan Metode DPPH. 2013. PhD Thesis. Tanjungpura University.
 27. Farzei, et al. Targetting Inflammation by Flavonoids: Novel Therapeutic Strategy for Metabolic Disorder. *Int. J. Mol*. 2019. 20, 4957
 28. Nair, Madhavan P., et al. The flavonoid quercetin inhibits proinflammatory cytokine (tumor necrosis factor alpha) gene expression in normal peripheral blood mononuclear cells via modulation of the NF- κ B system. *Clinical and vaccine immunology*, 2006, 13.3: 319-328.
 29. Wulan, O. T., & Indradi, R. B. Profil Fitokimia dan Aktivitas Farmakologi Gedi (*Abelmoschus manihot* (L.) Medik.). *Farmaka*, 2018. 16(2).
 30. Serafini, Mauro; Peluso, Ilaria; Raguzzini, Anna. Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2010, 69.3: 273-278.
 31. Rathee, Permender, et al. Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review. *Inflammation & allergy-drug targets*

- (formerly current drug targets-inflammation & allergy), 2009, 8.3: 229-235.
32. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*. 2001;50(6):537-546.
 33. 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.
 34. Izzi, Valerio, et al. The effects of dietary flavonoids on the regulations on the regulation of redox inflammatory networks. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2012, 17.7:2396-2418.
 35. Skibola, Christine F & Martyn T Smith. Potential Health Impact of Excessive Flavonoid Intake. Elsevier. 2000; 29: 375-383.
 36. Kung G, Konstantinidis K, Kitsis RN. Programmed necrosis, not apoptosis, in the heart. *Circulation research*. 2011 Apr 15;108(8):1017-1036.
 37. Kumar, Vinay; Abbas, A. K.; Aster, J. C. Robbins basic pathology. 9th. Philadelphia, USA, Saunders: Elsevier, 2013, 2572013.
 38. Pihlaja, Rea; Haaparanta-Solin, Merja; Rinne, Juha O. The anti-inflammatory effects of lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibitors in inflammation-induced human fetal glia cells and the A β degradation capacity of human fetal astrocytes in an ex vivo assay. *Frontiers in neuroscience*, 2017, 11: 299.
 39. Alverina, Cindy; Andari, Desi; Prihanti, Gita Sekar. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lam.) Terhadap Sel Kardiomyosit Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus* Strain Wistar) dengan Diet Aterogenik. *Saintika Medika: Jurnal Ilmu Kesehatan dan Kedokteran Keluarga*, 2016, 12.1: 30-37.
 40. Ajie, Rizky Bayu. White dragon fruit (*Hylocerus undatus*) Potential as Diabetes Mellitus Treatment. *Jurnal Majority*, 2015, 4.1.
 41. Sakimoto, T., Yamada, A., & Sawa, M. Release of soluble tumor necrosis factor receptor 1 from corneal epithelium by TNF- α -converting enzyme-dependent ectodomain shedding. *Investigative ophthalmology & visual science*, 2009, 50(10), 4618-4621.
 42. Horiuchi, T., Mitoma, H., Harashima, S. I., Tsukamoto, H., & Shimoda, T. Transmembrane TNF- α : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology*, 2010, 49(7), 1215-1228.
 43. Xu, Tao, et al. Oxidative stress in cell death and cardiovascular diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019, 2019.
 44. Kicinska, Anna; Jarmuszkiewicz, Wiesława. Flavonoids and Mitochondria: Activation of Cytoprotective Pathways?. *Molecules*, 2020, 25.13: 3060.
 45. Elabscience. Rat TNF- α (*Tumor Necrosis Factor Alpha*) ELISA Kit. Elabscience Biotechnology Co Ltd, 2019, p;1-11
 46. Pambudi, Ridho, et al. Perbedaan Panjang Serta Berat Tubuh Fetus Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Galur Sprague-Dawley Terhadap Pemberian Asam Folat Pada Periode Kehamilan Yang Berbeda. 2017.
 47. Nugraheni, Kartika Pengaruh Pemberian Minyak Zaitun Ekstra Virgin Terhadap Profil Lipid Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Strain Sprague Dawley Hiperkolesterolemia. 2012. PhD Thesis. Diponegoro University.
 48. Tambunan, S., Malik, Z., & Ismawati, I. 2015. Histopatologi aorta torasika tikus putih (*Rattus norvegicus* strain Wistar) jantan setelah pemberian diet aterogenik selama 12 minggu. 2015. Doctoral dissertation, Riau University.
 49. Phielix, Esther; Roden, Michael. Assessing multiple features of mitochondrial function. *Diabetes*, 2013, 62.6: 1826-1828.
 50. Gawel S, Wardas M, Niedworok E, Wardas P. Malondialdehyde (MDA) as lipid peroxidation marker. *Wiad Lek*. 2004;57(9-10):453-455
 51. Anam, Ilum, et al. Perbedaan pH Lambung pada Pasien Dispepsia dengan atau Tanpa Diabetes Mellitus Tipe 2. *Jurnal Penyakit Dalam Indonesia*. 2014, 1.2:114-119
 52. Prasetyo, Bayu Bagus. Penambahan CMC (Carboxy Methyl Cellulose) pada Pembuatan Minuman Madu Sari Buah Jambu Merah (*Psidium guajava*) ditinjau dari pH, viskositas Total Kapang dan Mutu Organoleptik. 2014. PhD Thesis. Universitas Brawijaya