

EFEK EKSTRAK ETANOL DAUN GEDI MERAH (*ABELMOSCHUS MANIHOT* (L.) MEDIK) TERHADAP KADAR SEL T CD4⁺ DAN TUMOR NECROSIS FACTOR ALFA TIKUS MODEL DIABETES MELITUS TIPE 2

Nanda Robby Setyawan, Helmin Elyani, Yudi Purnomo*
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang (UNISMA)

ABSTRAK

Pendahuluan: Inflamasi berperan dalam terjadinya resistensi insulin pada diabetes melitus (DM). *Abelmoschus manihot* (L.) Medik diketahui memiliki efek antioksidan dan antiinflamasi yang diharapkan dapat menurunkan inflamasi pada patofisiologi DM. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek ekstrak etanol *Abelmoschus manihot* (L.) Medik terhadap kadar sel T CD4⁺ dan TNF- α tikus model DM.

Metode: Tikus *sprague dawley* jantan usia 4-6 minggu, dikelompokkan menjadi 2 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan (n=25 ekor). Tikus DM dibuat dengan diet tinggi lemak-fruktosa (DTLF) dan streptozotocin (STZ) 25 mg/kgBB i.p *multiple dose*. Ekstrak etanol daun gedi merah (EEDGM) diberikan per oral selama 4 minggu dengan dosis 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB dan 800 mg/kgBB. Pengukuran persentase sel T CD4⁺ dan TNF- α menggunakan flowcytometry. Analisa data menggunakan One Way Anova dilanjutkan dengan uji LSD (p<0,05).

Hasil: Induksi DTLF dan STZ pada KDM meningkatkan kadar sel T CD4⁺ sekitar 15% dan meningkatkan TNF- α 2 kali lipat dibandingkan KN (p<0,05). Pemberian EEDGM dosis 200, 400, 800 mg/kgBB menurunkan kadar sel T CD4⁺ berturut-turut sekitar 20%, 30% dan 25% dibandingkan KDM (p<0,05). Pemberian EEDGM dosis 200 mg/kgBB menurunkan kadar TNF- α sekitar 50% dibandingkan KDM (p<0,05).

Kesimpulan: Pemberian EEDGM menurunkan kadar sel T CD4⁺ dan kadar TNF- α pada tikus model diabetes mellitus.

Kata Kunci : diabetes ,inflamasi,Diet tinggi lemak, diet tinggi fruktosa, streptozotocin.

*Korespondensi

Yudi Purnomo

Jl. MT. Haryono 193 Malang, Jawa Timur, Indonesia, 65144

email : yudi.purnomo@unisma.ac.id, Telpn : (0341) 558959

EFFECT ETHANOL EXTRACT OF *ABELMOSCHUS MANIHOT* (L.) MEDIK ON CD4⁺T CELL AND TUMOR NECROSIS FACTOR ALFA LEVELS IN TYPE 2 DIABETIC RAT MODEL

Nanda Robby Setyawan, Helmin Elyani, Yudi Purnomo*
Faculty of Medicine University of Islam Malang (UNISMA)

ABSTRACT

Introduction: Inflammation has a role in insulin resistance in diabetes mellitus (DM). *Abelmoschus manihot* (L.) Medik have been known as antioxidant and anti-inflammatory to reduce inflammation in patophysiology DM. The aim of this study was to determine the effect of ethanol extract of *Abelmoschus manihot* (L.) Medik in percentages of CD4⁺ T cell and TNF- α in DM rat model.

Method: This study used the 4-6 weeks old Sprague Dawley male rats which were divided into two groups control and three groups treatments of the ethanol extract of red gedi leaves. The diabetic rats induced a high-fat fructose diet and 25 mg/kg BB of streptozotocin injection i.p with multiple doses. The rats were administrated orally ethanol extract of red gedi leaves for 4 weeks with doses 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB and 800 mg/kgBB. CD4⁺ T cells and TNF- α levels were measured by Flowcytometry. Data analyzed by using One Way ANOVA analysis and LSD (p<0,05).

Result : The induction of HFFD and STZ in KDM increase 15% CD4⁺T cells and two times TNF- α levels. EEDGM doses 200, 400, 800 mg/kgBB decreasing CD4⁺ T cell levels approximately 20%, 30% and 25% compared to KDM (p<0,05). EEDGM dose 200mg/kgBB decreasing TNF- α levels approximately 50% compared to KDM (p<0,05).

Conclusion: According to the result above, EEDGM can decrease CD4⁺ T cell and TNF- α percentages in DM rat model.

Keywords:diabetes,inflammation, streptozotocin, high fat diet, high fructose diet.

*Corresponding author :

Yudi Purnomo

Jl. MT. Haryono 193 Malang City, East Java, Indonesia, 65144

email : yudi.purnomo@unisma.ac.id, phone:(0341) 558959

PENDAHULUAN

Diabetes mellitus masih menjadi permasalahan kesehatan di dunia. Diabetes mellitus adalah penyakit kronis berupa gangguan metabolik menahun yang terjadi karena pankreas tidak menghasilkan cukup insulin, atau ketika tubuh tidak dapat secara efektif menggunakan insulin yang dihasilkannya¹. Angka kejadian penyakit diabetes mellitus diperkirakan mencapai 463 juta orang pada tahun 2019 dan jumlah ini diproyeksikan mencapai 578 juta pada tahun 2030. Angka kematian akibat diabetes mellitus pada tahun 2019 mencapai lebih dari 4 juta orang pada kelompok usia 20-79 tahun, dan diperkirakan akan terus meningkat setiap tahunnya². Kematian pada diabetes mellitus terjadi sekitar 65% yang disebabkan oleh komplikasi penyakit jantung dan stroke³.

Diabetes mellitus melibatkan reaksi inflamasi kronis yang menimbulkan gangguan sekresi dan sensitifitas insulin. Hiperglikemia pada diabetes mellitus meningkatkan produksi ROS melalui jalur autooksidasi glukosa, glikasi protein, dan aktivasi jalur metabolisme poliol. Pembentukan senyawa oksigen reaktif akan meningkatkan modifikasi lipid, DNA, dan protein pada berbagai jaringan yang menimbulkan kerusakan oksidatif⁴. ROS menginduksi produksi NADPH oxidase 2 untuk mengaktifkan makrofag 1 (M1). Makrofag mensekresikan kemokin MHC II yang berfungsi dalam rekrutemen sel T CD4⁺. Sel T CD4⁺ mengaktifkan NF- κ B yang merupakan faktor transkripsi pembentukan sitokin proinflamasi seperti TNF- α , dan IFN- γ . Sitokin TNF- α menimbulkan fosforilasi reseptor insulin di jaringan sehingga menurunkan respon signaling insulin. Penurunan sensitifitas dan sekresi insulin akan memperparah kondisi hiperglikemia pada diabetes mellitus⁵.

Salah satu bahan alam yang dapat dipakai sebagai pengobatan anti diabetes adalah daun gedi merah (*Abelmoschus manihot* (L.) Medik). Daun gedi merah digunakan oleh masyarakat Sulawesi Utara sebagai obat tradisional untuk pengobatan kolesterol, tekanan darah tinggi, dan kencing manis⁶. Pada uji preklinik, Ekstrak daun gedi merah mengandung flavonoid, alkaloid, saponin dan tanin. Flavonoid terutama quercetin memiliki efek anti inflamasi dengan cara menghambat NF- κ B^{7,8}. Hingga saat ini penelitian tentang daun gedi merah dalam menghambat reaksi inflamasi kronis pada tikus model diabetes mellitus belum pernah dilakukan. Berdasarkan latar belakang tersebut perlu dilakukan penelitian tentang efek ekstrak etanol daun gedi merah (*abelmoschus manihot* (L.) medik) terhadap kadar sel T CD4⁺ dan TNF- α tikus model diabetes mellitus.

METODE

Desain penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental laboratorium secara *in vivo* dengan *control group post test only design*. Penelitian ini telah mendapat persetujuan etik dari komite etik penelitian Universitas Brawijaya dengan nomor No. 028-KEP UB tahun 2020. Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus jantan galur *sprague dawley*. Usia tikus 4-6 minggu dengan berat badan sekitar 180-200 gram. Tikus dibedakan menjadi 5 Kelompok yaitu kelompok normal (KN), kelompok kontrol diabetes melitus (KDM) dan 3 kelompok ekstrak etanol daun gedi merah (EEDGM) dengan dosis 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB, dan 800 mg/kgBB.

Pembuatan Tikus Model Diabetes Melitus

Pembuatan tikus model DM dilakukan dengan 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 sore⁹. Pemberian fruktosa 20% terdiri dari 200 ml fruktosa dicampur kedalam 1000 ml air. Fruktosa 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 injeksi¹⁰.

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. Ekstraksi daun gedi merah menggunakan metode soxhletasi dengan serbuk daun gedi merah ditimbang sebanyak 25 gram dalam etanol 96%. Soxhletasi dilakukan sebanyak beberapa siklus dan dihentikan sampai pelarut berwarna bening dan jumlahnya berkurang. Hasil ekstraksi diuapkan dengan *rotary evaporator* untuk mendapatkan bentuk pasta. Ekstrak disuspensi dengan CMC-Na 0,1% sebelum disondekan¹¹. Ekstrak diberikan dalam 3 dosis berdasarkan penelitian Tandi dkk (2016) dengan modifikasi yaitu 200 mg/kgBB (40 mg diencerkan dalam 0,5 ml air), 400 mg/kgBB (80 mg diencerkan dalam 1 ml air), dan 800 mg/kgBB (160 mg diencerkan dalam 2 ml air)¹².

Pengorbanan Hewan Coba dan Isolasi Sel Limfosit T pada Jaringan Lien

Hewan coba dianestesiakan dengan injeksi ketamin 0,2 ml intramuskuler, kemudian tikus dibedah secara vertikal mengikuti linea media untuk dilakukan pengambilan organ lien. Lien ditimbang dengan berat sekitar 100 mg. Lien dibilas dalam cawan petri dengan larutan PBS sebanyak 3 kali, lalu dimasukkan kedalam cawan petri berbeda yang berisi 5 ml PBS dan digerus menggunakan pangkal spuit searah jarum jam. Kemudian disaring dengan *wire*, dimasukkan dalam tabung propilen 15 ml, diberi PBS $\pm$ 5 ml pada saringan sel. Lalu disentrifus pada kecepatan 2500 rpm, 5 menit, suhu 10 derajat. Setelah itu supernatan dibuang dan pelet sel yang terbentuk diresuspensi dengan PBS 1 ml.

Pewarnaan Sel T CD4⁺

Suspensi sel lien kemudian dibagi ke 25 micro tube 1,5 ml yang telah berisi $\pm$ 0,5ml PBS. Lalu disentrifus pada kecepatan 2500 rpm, 5 menit, suhu 10 derajat. Setelah itu supernatan dibuang hingga tinggal pelet. Pewarnaan Sel T CD4⁺ dilakukan dengan menambahkan 1 mikroliter larutan antibodi spesifik (*FITC-conjugated rat anti-mouse CD4*) yang diencerkan dengan 50 mikroliter PBS 10% FBS dan selanjutnya di inkubasi selama 20 menit pada suhu 4 derajat celcius, di ruang gelap.

Pewarnaan TNF- α

Pewarnaan TNF- α dilakukan dengan menambahkan larutan fiksatif (cytofix/cytoperm) sebanyak 50 mikroliter dan di inkubasi selama 20 menit pada suhu 4°C, di ruang gelap. Selanjutnya ditambahkan larutan permeabilitas (washperm) sebanyak 500 mikroliter dan dihomogenisasi. Kemudian disentrifus pada kecepatan 2500 rpm, 5

menit, suhu 10 derajat dan supernatan dibuang. Pelet diwarnai dengan antibodi intraselular (*PE-conjugated rat anti-mouse TNF- α*), lalu inkubasi selama 20 menit, di ruang gelap.

Pengukuran Kadar Sel T CD4⁺ dan TNF- α dengan Flowcytometry

Pelet dimasukkan dalam tabung kuvet pada *flowcytometry* dengan mikropipet, lalu ditambahkan 500 μ l PBS dan dihomogenkan dengan pipeting. Kuvet dipasang pada *nozzle BD Biosciences FACSCaliburTM flowcytometry*.

Pembacaan Kadar Sel T CD4⁺ dan TNF- α dengan Flowcytometry

Pada grafik scatter, sumbu x semakin ke kanan, maka ukuran sel semakin besar. Sedangkan pada sumbu y, semakin ke atas maka semakin tinggi granularitas sel tersebut. Pemilihan gate untuk CD4⁺ terdapat pada bagian kanan bawah pada grafik scatter sesuai dengan bentuk sel CD4⁺. Jumlah CD4⁺ dihitung dengan cara menjumlah presentase CD4⁺ pada kuadran kanan atas dan kanan bawah tabel gate, sedangkan jumlah TNF- α dihitung dengan cara menjumlah presentase TNF- α pada kuadran kanan atas tabel gate.

Analisa Statistik

Data yang diperoleh dilakukan uji normalitas dan homogenitas, kemudian dilakukan uji beda menggunakan metode statistik parametrik yaitu *one way ANOVA*. Selanjutnya dilakukan uji metode *post hoc test* sebagai uji perbandingan berganda (*multiple comparisons*) dengan uji *least significance different* (LSD). Hasil dinyatakan bermakna apabila nilai $p < 0,05$. Analisa data dilakukan dengan memakai software statistik SPSS versi 26.

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	304.8 $\pm$ 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
Δ KGDP (mg/dL)	11,6 $\pm$ 13,7	32.8 $\pm$ 34.3	41.0 $\pm$ 9.7	51.4 $\pm$ 33.0	49.8 $\pm$ 6.2

Keterangan

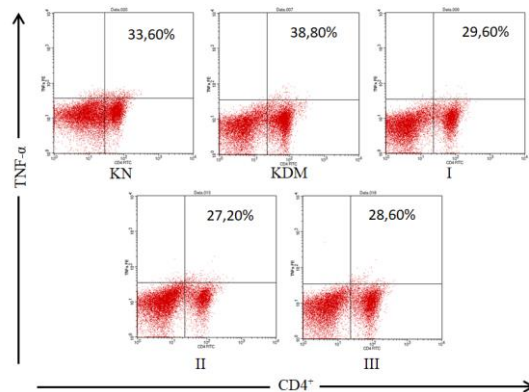
Data dalam mean $\pm$ SD. Uji statistik menggunakan *One Way Anova* dan *Post Hoc LSD test*, BB: Berat Badan, Δ BB: selisih BB post treat dan pre treat, KGDP : Kadar Glukosa Darah Puasa, Δ KGDP: selisih KGDP post treat dan pre treat, KN: Kontrol Negatif, KDM: Kontrol Diabetes Melitus, EEDGM: pemberian ekstrak etanol daun gedi merah. Notasi yang berbeda menunjukkan signifikansi ($p < 0,05$).

Berdasarkan **Tabel 1**, berat badan pra perlakuan relatif tidak berbeda pada semua kelompok ($p>0,05$). Berat badan pasca perlakuan pada kelompok KDM lebih rendah dibandingkan kelompok KN ($p<0,05$). Sedangkan berat badan pasca perlakuan kelompok ekstrak DGM lebih tinggi dibandingkan kelompok KDM ($p<0,05$).

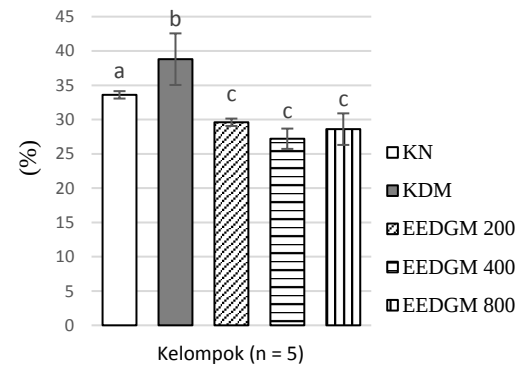
Persentase asupan pakan pada kelompok KDM lebih rendah dibandingkan kelompok KN. Kadar gula darah puasa (KGDP) pra perlakuan cenderung meningkat pada kelompok perlakuan setelah induksi DTLF dan STZ dibandingkan kelompok KN ($p<0,05$). KGDP pasca perlakuan pada kelompok ekstrak DGM lebih rendah dibandingkan kelompok KDM ($p<0,05$).

Kadar sel T CD4⁺ pada hewan coba tikus jantan galur *Sparague dawley* dengan DM setelah diberikan Ekstrak Etanol Daun Gedi Merah

Efek pemberian ekstrak etanol daun gedi merah (*Abelmoschus manihot* (L.) Medik) terhadap kadar sel T CD4⁺ tikus model diabetes melitus dapat dilihat pada **gambar 1** dan **gambar 2**. Induksi DM dengan pemberian DTLF dan STZ meningkatkan kadar T CD4⁺ secara signifikan sekitar 15% dibandingkan kelompok kontrol normal ($p<0,05$). Pemberian EEDGM dosis 200, 400, 800 mg/kgBB secara signifikan menghambat peningkatan T CD4⁺ tikus model DM berturut-turut sekitar 20%, 30% dan 25% dibandingkan KDM ($p<0,05$). Tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok EEDGM 200, 400, 800 mg/kgBB dalam menghambat peningkatan kadar T CD4⁺ ($p>0,05$).



Gambar 1. Kadar Sel T CD4⁺ pada kelompok KN; KDM; (I) EEDGM 200 mg/kgBB; (II) EEDGM 400 mg/kgBB; (III) EEDGM 800 mg/kgBB.

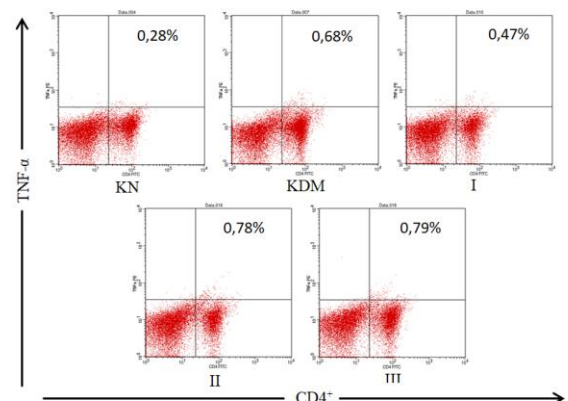


Gambar 2. Histogram kadar sel T CD4⁺ pada tikus model diabetes mellitus yang telah diberikan ekstrak etanol daun gedi merah

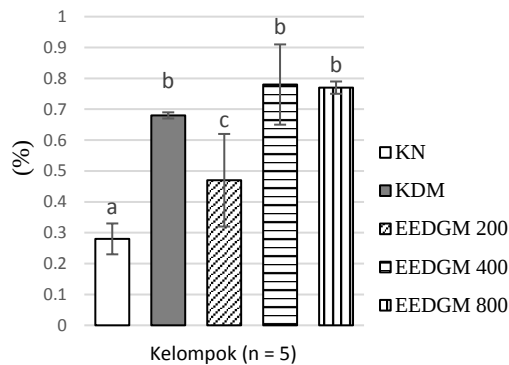
Keterangan : Data dalam mean $\pm$ SD. Uji statistik menggunakan *One Way Anova* dan *Post Hoc LSD test*, KN: Kontrol Negatif, KDM: Kontrol Diabetes Melitus, EEDGM 200,400,800: pemberian ekstrak etanol daun gedi merah dosis 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB dan 800 mg/kgBB. Huruf berbeda menunjukkan perbedaan signifikan ($p<0,05$, *LSD test*) terhadap kadar sel T CD4⁺ tikus model diabetes mellitus.

Kadar TNF- α pada hewan coba tikus jantan galur *Sparague dawley* dengan DM setelah diberikan Ekstrak Etanol Daun Gedi Merah

Efek pemberian ekstrak etanol daun gedi merah (*Abelmoschus manihot* (L.) Medik) terhadap kadar TNF- α tikus model diabetes melitus dapat dilihat pada **gambar 3** dan **gambar 4**. Induksi DM dengan pemberian DTLF dan STZ meningkatkan kadar TNF- α secara signifikan sekitar 2 kali lipat dibandingkan kelompok kontrol normal ($p<0,05$). Pemberian EEDGM dosis 200 mg/kgBB secara signifikan menghambat peningkatan kadar TNF- α tikus model DM sekitar 50% dibandingkan KDM ($p<0,05$), sedangkan pemberian EEDGM dosis 400 dan 800 mg/kgBB tidak signifikan menghambat peningkatan kadar TNF- α dibandingkan KDM ($p<0,05$).



Gambar 3. Kadar TNF- α pada kelompok KN; KDM; (I) EEDGM 200 mg/kgBB; (II) EEDGM 400 mg/kgBB; (III) EEDGM 800 mg/kgBB.



Gambar 4. Histogram kadar TNF- α pada tikus model diabetes mellitus yang telah diberikan ekstrak etanol daun gedi merah

Keterangan : Data dalam mean $\pm$ SD. Uji statistik menggunakan *One Way Anova* dan *Post Hoc LSD test*, KN: Kontrol Negatif, KDM: Kontrol Diabetes Melitus, EEDGM 200,400,800: pemberian ekstrak etanol daun gedi merah dosis 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB dan 800 mg/kgBB. Huruf berbeda menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$, Tukey Test) terhadap kadar TNF- α tikus model diabetes mellitus.

PEMBAHASAN

Karakteristik Sampel

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus *Sprague dawley* jantan berusia 4-6 minggu. Pemilihan galur *Sprague dawley* dikarenakan tikus jenis ini memiliki kemampuan yang baik dalam beradaptasi dengan lingkungan dan mudah dalam perawatannya. Tikus jantan dari galur ini dipilih untuk penelitian karena tidak berpengaruh pada siklus hormonal¹³.

Pada kelompok perlakuan mengalami peningkatan berat badan (BB) pasca perlakuan dibandingkan kelompok kontrol diabetes melitus. Hal ini diduga karena terdapatnya senyawa aktif pada EEDGM seperti alkaloid dan flavonoid. Senyawa alkaloid pada EEDGM diduga mampu meningkatkan berat badan dengan cara meningkatkan sekresi insulin dan flavonoid juga dengan cara meningkatkan sensitivitas reseptor insulin. Peningkatan sekresi insulin dan sensitivitas insulin dapat meningkatkan pemasukan glukosa ke dalam sel sehingga lipolisis dihambat¹¹. Sedangkan BB pasca perlakuan pada KDM berbeda signifikan lebih rendah dibandingkan dengan KN. Hal ini disebabkan karena induksi DTLF dan STZ memicu terjadinya resistensi insulin dan kerusakan sel β pankreas. Kondisi ini menyebabkan glukosa tidak dapat masuk ke dalam sel sehingga meningkatkan terjadinya lipolisis yang menyebabkan BB pasca perlakuan pada KDM lebih rendah dibandingkan KN^{14,15}. Pada hasil pengukuran asupan pakan didapatkan penurunan nafsu makan pada KDM dibandingkan KN. Hal tersebut diduga karena komponen lemak dalam pakan sulit dicerna sehingga memperlama pengosongan lambung. Hal ini menyebabkan rasa kenyang sehingga terjadi penurunan asupan pakan pada KDM¹⁶.

Kadar Glukosa Darah Puasa (KGDP) pasca perlakuan pada KDM cenderung lebih tinggi dibandingkan dengan KN. Hal ini disebabkan karena induksi dari DTLF dan STZ pada KDM memicu terjadinya resistensi insulin dan kerusakan sel β pankreas sehingga memicu peningkatan KGDP pasca perlakuan. Hal ini sejalan dengan penelitian Vatandoust dkk (2018) bahwa induksi DTLF selama 10 minggu ditambah pemberian STZ diminggu ke 4 meningkatkan kadar glukosa darah dibandingkan dengan KN²⁰. Pemberian EEDGM secara signifikan dapat menurunkan KGDP dibandingkan dengan KDM. Hal ini disebabkan karena kandungan senyawa aktif dari daun gedi merah seperti alkaloid dan flavonoid yang memicu peningkatan sekresi insulin melalui regenerasi sel β pankreas dan meningkatkan sensitivitas reseptor insulin sehingga meningkatkan penyerapan glukosa ke dalam sel dan menurunkan KGDP pada tikus model DM¹¹.

Efek Pemberian DTLF dan STZ terhadap Kadar Sel T CD4⁺ dan TNF- α Tikus Model Diabetes Mellitus

Induksi DTLF dan STZ pada kelompok kontrol DM meningkatkan kadar T CD4⁺ dan kadar TNF- α dibandingkan kelompok kontrol normal. Hal ini disebabkan karena pemberian diet tinggi lemak dalam jumlah besar dan durasi lama akan meningkatkan *Free Fatty Acid* (FFA). Peningkatan FFA juga dapat meningkatkan *Protein Kinase C* (PKC), PKC adalah enzim yang memfosforilasi serin pada reseptor insulin dan Insulin Receptor Substrat (*IRS-1* dan *IRS-2*). Fosforilasi serin pada *IRS-1* dan *IRS-2* dapat menyebabkan penurunan kemampuan *IRS* untuk mengaktifasi *PI 3 kinase*, sehingga menyebabkan kinerja GLUT menurun dan reseptor insulin signalling berkurang. Sehingga terjadi resistensi insulin^{17,18}.

Induksi diet tinggi fruktosa (DTF) dapat memicu metabolisme fruktosa oleh hepar. Penyerapan fruktosa dari intestinal masuk ke dalam *vena porta hepatica* dibantu oleh glukosa transporter 5 (GLUT-5) kemudian masuk ke dalam hepatosit melalui GLUT-2. Di dalam hepatosit fruktosa akan diubah menjadi *fruktosa 1-fosfat* oleh enzim *fruktokinase*, kemudian oleh enzim *aldolase B* diubah menjadi *triose fosfat*. Penumpukan triose fosfat menstimulasi sintesis glikogen dan asam lemak dari karbon pada fruktosa melalui jalur metabolik *de novo lipogenesis*. Pembentukan asam lemak dari proses *de novo lipogenesis* yang berlebihan dapat menurunkan sensitivitas insulin sehingga terjadi resistensi insulin. Resistensi insulin memicu kondisi hiperglikemia¹⁷.

Pemberian streptozocin (STZ) menyebabkan kerusakan pada sel β pankreas sehingga menurunkan sintesis insulin. Streptozotocin memasuki sel β melalui transporter glukosa (GLUT 2) dan menyebabkan alkilasi DNA. Kerusakan DNA menginduksi aktivasi poly ADP-ribosylation, yang menyebabkan deplesi NAD⁺ dan ATP seluler.

Peningkatan defosforilasi ATP setelah induksi streptozotocin menghasilkan substrat bagi reaksi katalisis xantin oksidase yang menghasilkan radikal superoksida. Akibatnya hidrogen peroksida dan radikal hidroksil juga terbentuk. Selanjutnya, streptozotocin membebaskan banyak zat toksik dari nitric oksid yang menghambat aktivitas aconitase dan berperan pada kerusakan DNA, yang pada akhirnya terjadi apoptosis dan nekrosis sel β ²⁰.

Hotamisligil et al. menjelaskan bahwa terdapat peningkatan dari TNF- α pada jaringan lemak hewan model diabetes dan obesitas²¹. Studi terbaru oleh Shirakawa et al. menjelaskan bahwa terdapat peningkatan aktivitas sel T CD4⁺ pada jaringan lemak tikus model obesitas²³. Ditemukan juga bahwa tikus obesitas menginduksi ekspresi MHC class II yang mengaktifkan sel T CD4⁺ untuk menginisiasi terjadinya inflamasi pada jaringan lemak²⁴. Sel T berperan penting dalam mempromosi proses inflamasi dan resistensi insulin dengan menginduksi pelepasan sitokin proinflamasi pada organ metabolik, seperti jaringan lemak, hati, otot, dan pankreas. Pada hewan obesitas, sel T CD4⁺ akan meningkat pada jaringan lemak dan menginfeksi rekrutmen dan diferensiasi dari Makrofag M1²⁵. Makrofag M1 melepaskan sitokin proinflamasi seperti TNF- α , IL-6, and IL-1 β , yang berkontribusi dalam terjadinya inflamasi lokal dan sistemik²⁶.

Pada kondisi diabetes kadar TNF- α meningkat dan TNF- α menginduksi resistensi insulin pada otot dan adiposit. Mekanisme resistensi insulin disebabkan akibat TNF- α mengikat reseptor 1 TNF dan mengaktifkan sphingomyelinase yang memetabolisme sphingomyelin menjadi ceramide. Ceramide meningkatkan fosforilasi serin pada substrat reseptor insulin-1 (IRS-1), yang menghambat fosforilasi tirosin reseptor insulin, mengakibatkan pelemahan pensinyalan insulin dan penurunan translokasi glukosa transporter-4 (GLUT-4) dan serapan glukosa. Insulin resistensi terkait dengan TNF- α pada hewan obesitas juga telah dilaporkan terjadi pada manusia obesitas²².

Induksi Induksi diet tinggi lemak fruktosa (DTLF) akan meningkatkan kadar *Free Fatty Acid* (FFA) dan Trigliserida (TG). Peningkatan FFA dan TG ini menyebabkan aktivasi *toll-like receptor-4* (TLR-4) dan terbentuknya sitokin proinflamasi IL-1, IL6, dan TNF- α . Hal ini menyebabkan peningkatan lipolisis adiposit dan fosforilasi serine/threonine IRS-1. Peningkatan ini kemudian menginduksi resistensi insulin dan disfungsi sel β pankreas²¹.

Streptozotocin sebagai agen diabetonik menyebabkan teraktivasinya limfosit T terutama CD4⁺ yang menghasilkan interferon γ (IFN γ). Interferon γ akan mengaktifasi makrofag yang menstimulasi produksi sitokin pro-inflamasi seperti IL -1 dan TNF - α serta memproduksi radikal bebas seperti superperoksida (O₂-), *hydrogen peroksida* (H₂O₂) dan *nitrit oxide* (NO)²⁰. Interferon- γ juga

mengaktifasi limfosit T CD8⁺ sitotoksik. Sitokin pr -inflamasi yang diproduksi akibat teraktivasinya makrofag menjadi sitotoksik ke sel β pankreas dengan mengirimkan *death signals* pada sel β sehingga terjadi nekrosis pada sel β pankreas²².

Efek Ekstrak Etanol Daun Gedi Merah (*abelmoschus manihot* (L.) Medik) terhadap Kadar Sel T CD4⁺ Tikus Model Diabetes Mellitus

Pemberian ekstrak etanol daun gedi merah secara signifikan menghambat peningkatan kadar sel T CD4⁺ tikus model DM. Efek tersebut berhubungan dengan kandungan senyawa aktif yang berperan sebagai antiinflamasi dan antidiabetik. Penurunan kadar sel T CD4⁺ pada tikus model DM dikarenakan kandungan yang terdapat dalam ekstrak etanol daun gedi merah salah satunya adalah quercetin yang dapat menghambat faktor transkripsi NF- κ B. Hambatan pada NF- κ B dapat menekan peningkatan CD4⁺^{7,8}. Flavonoid berperan sebagai *insulin sensitizer* yang menstimulasi sekresi insulin dan memberikan efek antioksidan terhadap ROS sehingga menghambat terjadinya kerusakan oksidatif¹¹. Hal ini menjadi dasar bahwa semakin tinggi dosis EEDGM yang diberikan, maka semakin tinggi pula kadar antioksidan yang terkandung dalam daun gedi merah, sehingga mampu menurunkan kadar sel T CD4⁺ selaku sel imunokompeten.

Alkaloid pada EEDGM berkhasiat untuk regenerasi sel β pankreas, sehingga dapat membantu dalam produksi insulin. Saponin dapat menurunkan kadar glukosa darah dengan menghambat aktivitas enzim alfa glukosidase¹¹. Menurunnya kadar sel T CD4⁺ karena pemberian EEDGM ini diharapkan mampu mencegah terjadinya komplikasi pada diabetes mellitus.

Pada penelitian ini, tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan pada penurunan kadar sel T CD4⁺ perlakuan dosis 200, 400, 800 mg/kgBB. Hal ini diduga karena lama pemberian EEDGM yang tergolong singkat atau dosis yang kurang serta interval antar dosis herbal terlalu dekat sehingga dengan pemberian dosis bertingkat tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan pada penurunan kadar sel T CD4⁺^{24,25}. Hal ini juga diduga karena pemberian EEDGM dosis bertingkat 200, 400, 800 mg/kgBB tidak memiliki efek dependent dose, sehingga pemberian dosis yang semakin meningkat tidak mempengaruhi penurunan kadar sel T CD4⁺ secara signifikan.

Efek Ekstrak Etanol Daun Gedi Merah (*abelmoschus manihot* (L.) Medik) terhadap Kadar TNF- α Tikus Model Diabetes Mellitus

Pemberian ekstrak etanol daun gedi merah dengan dosis 200 mg/kgBB secara signifikan menghambat peningkatan kadar sel T CD4⁺ tikus

model DM. Pemberian EEDGM dengan dosis 200 mg/kgBB dapat menurunkan kadar TNF- α pada kelompok kontrol DM. Hal ini disebabkan oleh kandungan senyawa aktif flavonoid pada daun gedi merah bertindak sebagai anti inflamasi dan antioksidan yang memiliki efek langsung pada penghambatan peningkatan TNF- α .

Tandi, *et al* (2016) menjelaskan bahwa terhambatnya peningkatan TNF- α terjadi karena adanya penurunan aktifitas faktor transkripsi NF κ B. Senyawa aktif flavonoid dan polifenol berperan sebagai *scavenger* radikal hidroksil dan superhidroksil yang menghambat terjadinya peroksidasi lipid membran sel β pankreas. Senyawa aktif flavonoid dan polifenol juga mencegah konversi superoksida menjadi rantai superoksida hidrogen dengan menyumbangkan atom hidrogen polifenol aromatik hidroksil (OH) yang dapat memicu penurunan produksi ROS. Penurunan produksi ROS menghambat terjadinya stress oksidatif serta kerusakan oksidatif jaringan sehingga tidak memicu terjadinya inflamasi dan pelepasan sitokin pro inflamasi TNF- α ¹¹.

Kandungan zat aktif lain pada daun gedi merah yaitu alkaloid memiliki aktivitas antidiabetik. Alkaloid menginduksi penurunan kadar glukosa darah dengan menstimulasi hipotalamus untuk meningkatkan *Growth Hormone Releasing Hormone* (GHRH) sehingga memicu sekresi *Growth Hormone* (GH) pada hipofisis. Peningkatan sekresi GH memicu hepar melepaskan *Insulin-like Growth Factor-1* (IGF-1) yang menginduksi penurunan kadar glukosa darah sehingga menghambat peningkatan pelepasan sitokin pro inflamasi TNF- α ¹¹.

Pemberian ekstrak etanol daun gedi merah dengan dosis 400, dan 800 mg/kgBB secara signifikan meningkatkan kadar sel T CD4⁺ tikus model DM. Pemberian EEDGM dalam dosis 400, dan 800 mg/kgBB tidak mampu menghambat peningkatan kadar TNF- α pada kelompok kontrol DM. Hal ini diduga karena lama pemberian EEDGM yang tergolong singkat sehingga dengan pemberian dosis bertingkat belum mampu untuk menghambat penurunan kadar TNF- α yang disebabkan peningkatan produksi ROS^{27,28}. Hal ini juga diduga karena pemberian dosis 400 mg/kgBB dan 800 mg/kgBB ekstrak etanol daun gedi merah cenderung mempunyai efek toksisitas²⁹. Selain itu, kandungan flavonoid EEDGM pada 400 mg/kgBB dan 800 mg/kgBB diduga bersifat pro-oksidan serta mengalami auto-oksidasi menjadi radikal bebas dan menginduksi terjadinya peroksidasi lipid. Mekanisme auto-oksidasi tersebut disebabkan oleh penghambatan enzim *succinoxidase* di mitokondria sehingga terbentuk radikal bebas seperti radikal hidroksil dan terjadi peroksidasi lipid^{29,30}.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian dan pembahasan di atas maka dapat ditarik kesimpulan bahwa:

1. Pemberian DTLF dan STZ meningkatkan kadar sel T CD4⁺ dan meningkatkan kadar TNF- α tikus model DM
2. Pemberian ekstrak etanol daun gedi merah dosis 200, 400, 800 mg/kgBB menghambat peningkatan kadar sel T CD4⁺ tikus model DM.
3. Pemberian ekstrak etanol daun gedi merah dosis 200 mg/kgBB menghambat peningkatan kadar TNF- α tikus model DM.

SARAN

1. Melakukan penelitian lebih lanjut terkait uji toksisitas ekstrak etanol daun gedi merah (*Abelmoschus manihot* (L.) Medik) pada tikus.
2. Melakukan penelitian lebih lanjut terkait HOMA-IR untuk memastikan terjadinya resistensi insulin pada tikus model diabetes.
3. Melakukan penelitian lebih lanjut terkait uji fitokimia untuk mengetahui kandungan kimia metabolit suatu herbal.

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] WHO. Global Report On Diabetes. France: World Health Organization. 2016.
- [2] International Diabetes Federation (IDF). IDF DIABETES ATLAS Ninth edition. 2019.
- [3] AHA (American Heart Association). Heart disease and stroke statistics update. 2012.
- [4] Ueno Y, Kizaki M, Nakagiri R, Kamiya T, Sumi H, Osawa .Dietary glutathione protects rats from diabetic nephropathy and neuropathy. *J Nutr*. 2002;132:897-900.
- [5] Dinia RD, M. Sasmito D, Mansur I and Muhaimin R. The Potential of VipAlbumin to Chronic Inflammation in Type 2 Diabetes Mellitus Balb/C Mice Model. *American Journal of Immunology*.2015.
- [6] Fattah, Yusuf R. Identifikasi Barcode Tumbuhan Gedi Merah (*Abelmoschus manihot* L. medik) dan Gedi Hijau (*Abelmoschus moschatus*) Berdasarkan Gen matK. *Jurnal MIPA*, 2014, 3.2: 120-124
- [7] Tandil, Joni. Efektivitas Ekstrak Daun Gedi Merah terhadap Glukosa Darah, Malondialdehid, 8-Hidroksi-Deoksiguanosin, Insulin Tikus Diabetes. *Journal of Tropical*

- Pharmacy and Chemistry*, 2016, 3.4: 264-276.
- [8] Leyva L, Gutierrez G, Ambriz P, Heredia, J. B. Flavonoid as Cytokine Modulators: A Possible Therapy for Inflammatory Related Diseases. *Internasional journal of molecular sciences*. 2016; 17(6): 921
- [9] Murwani S, Ali M, Muliarta K. Diet atherogenik pada tikus putih (*Rattus norvegicus* strain Wistar) sebagai model hewan aterosklerosis. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 2013 Apr 18;22(1):6-9.
- [10] Xiang X, Wang Z, Zhu Y, Bian L, Yang Y. Dosage of streptozotocin in inducing rat model of type 2 diabetes mellitus. Wei sheng yan jiu = *Journal of hygiene research*. 2010 Mar;39(2):138-42.
- [11] Prasetyo B, Purwadi, Rosyidi D. Penambahan CMC (*Carboxy Methyl Cellulose*) Pada Pembuatan Minuman Madu Sari Buah Jambu Merah (*Psidium guajava*) ditinjau dari pH, Viskositas, Total Kapang dan Mutu Organoleptik. *Jurnal Brawijaya*. 2014.
- [12] Tandi J, As'ad S, Natzir R, Bukhari A. Test Of Ethanolextract Red Gedi Leaves (*Albemoschus Manihot* (L.) Medik) In White Rat (*Rattus Norvegicus*) Type 2 Diabetes Mellitus. *International Journal Of Sciences*. 2016;30(4):84-94
- [13] Amin RH, Mathews ST, Camp HS, Ding L, Leff T. Selective activation of PPAR γ in skeletal muscle induces endogenous production of adiponectin and protects mice from diet-induced insulin resistance. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2010 Jan;298(1):E28-37.
- [14] Eleazu CO, Eleazu KC, Chukwuma S, Essien UN. Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. *Journal of diabetes & metabolic disorders*. 2013 Dec 1;12(1):60.
- [15] Schuff-Werner P, Fenger S, Kohlschein P. Role of lipid apheresis in changing times. *Clinical research in cardiology supplements*. 2012 Jun 1;7(1):7-14.
- [16] Vatandoust N, Rami F, Salehi AR, Khosravi S, Dashti G, Eslami G, Momenzadeh S, Salehi R. Novel high-fat diet formulation and streptozotocin treatment for induction of prediabetes and type 2 diabetes in rats. *Advanced Biomedical Research*. 2018;7.
- [17] Boden, Guenther; Laakso, Markku. Lipids and glucose in type 2 diabetes: what is the cause and effect?. *Diabetes care*, 2004, 27.9: 2253-2259.
- [18] Wulansari, Devyana Dyah. Pengembangan Model Hewan Coba Tikus Diabetes Mellitus Tipe 2 dengan Induksi Diet Tinggi Fruktosa Intragastrik. *MPI (Media Pharmaceutica Indonesiana)*, 2018, 2.1: 41-47.
- [19] Szkuldeski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*. 2001; 50: 536-46
- [20] Pietropaolo, M., Towns, R. GAD65 Autoantibodies and its Role as Biomarker of Type 1 Diabetes and Latent Autoimmune Diabetes in Adults LADA. *Drugs Future*. 2011 Nov; 3611: 847.
- [21] Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science*. 1996;271(5249):665-668.
- [22] Sabirosi, B. G. Ekspresi Tumor Necrosis Factor - α (tnf- α) dan Jumlah Sperma pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Diabetes Mellitus Tipe 1 Hasil Induksi Streptozotocin yang Diterapi dengan Ekstrak Etanol Rimpang Kunyit (*Curcuma longa* L.). *Skripsi Universitas Brawijaya*. 2012.
- [23] K. Shirakawa, X. Yan, K. Shinmura et al., "Obesity accelerates T cell senescence in murine visceral adipose tissue," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 126, no. 12, pp. 4626-4639, 2016.
- [24] T. Deng, C. J. Lyon, L. J. Minze et al., "Class II major histocompatibility complex plays an essential role in obesity-induced adipose inflammation," *Cell Metabolism*, vol. 17, no. 3, pp. 411- 422, 2013.
- [25] S. Nishimura, I. Manabe, M. Nagasaki et al., "CD8 $^{+}$ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity," *Nature Medicine*, vol. 15, no. 8, pp. 914-920, 2009.
- [26] C. N. Lumeng, J. L. Bodzin, and A. R. Saltiel, "Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 117, no. 1, pp. 175-184, 2007.
- [27] Mercedes A. Aktivitas antidiabetes kombinasi ekstrak daun gedi merah dan daun semak bunga putih tikus induksi streptozotocin. *Farmakologika: Jurnal Farmasi*. 2017;14(2):159-66.
- [28] Waris R, Najib A. Radical scavenging activity of leaf extract of edible Hibiscus (*Abelmoschus manihot* (L.) Medik) using 1, 1-

Diphenyl-2-Picryl Hydrazil (DPPH).
International Journal of PharmTech Research. 2016;9(6):343-7.

- [29] Salehi B, Azzini E, Zucca P, Maria Varoni E, V Anil Kumar N, Dini L, Panzarini E, Rajkovic J, Valere Tsouh Fokou P, Peluso I, Prakash Mishra A. Plant-derived bioactives and oxidative stress-related disorders: a key trend towards healthy aging and longevity promotion. *Applied Sciences*. 2020 Jan;10(3):947.
- [30] Skibola CF, Smith MT. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free radical biology and medicine*. 2000 Aug 1;29(3-4):375-83.