

**EFEK EKSTRAK ETANOL DAUN GEDI MERAH (*Abelmoschus manihot* (L.) Medik)
TERHADAP PERSENTASE INTERLEUKIN-10 (IL-10) DAN SEL T SITOTOKSIK (CD8⁺)
TIKUS MODEL DIABETES Tipe II**

Nur Kamilah, Reza Hakim, Yudi Purnomo*
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

ABSTRAK

Pendahuluan: Inflamasi akibat kerusakan oksidatif yang dipicu hiperglikemia berperan terhadap progresivitas diabetes melitus (DM). Interleukin-10 (IL-10) dan CD8⁺ berpengaruh terhadap proses inflamasi. *Abelmoschus manihot* (L.) Medik memiliki efek antiinflamasi dan antioksidan yang diharapkan dapat menurunkan inflamasi pada patofisiologi DM. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek ekstrak etanol *Abelmoschus manihot* (L.) Medik terhadap persentase IL-10 dan CD8⁺ tikus model DM.

Metode: Tikus *Sprague Dawley* jantan, 4-6 minggu dikelompokkan menjadi kelompok kontrol normal (KN), kelompok kontrol diabetes melitus (KDM), kelompok ekstrak etanol daun gedi merah (EEDGM) 200 mg/kgBB, EEDGM 400 mg/kgBB dan EEDGM 800 mg/kgBB (n=5). Hewan coba diinduksi diet tinggi lemak-fruktosa (DTLF) selama 10 minggu dan *Streptozotocin* (STZ) dosis rendah 25 mg/kgBB intraperitoneal dosis ganda pada minggu ke 4. EEDGM 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB dan 800 mg/kgBB diberikan selama 4 minggu. Pengukuran persentase CD8⁺ dan IL-10 menggunakan *flowcytometry*. Analisa data menggunakan One Way Anova dilanjutkan dengan uji LSD ($p < 0,05$).

Hasil: Induksi DTLF dan STZ pada kelompok KDM menurunkan persentase IL-10 dan meningkatkan persentase CD8⁺ dibandingkan KN ($p < 0,05$). Pemberian EEDGM dosis 400 mg/kgBB dan 800 mg/kgBB signifikan meningkatkan persentase IL-10 berturut-turut sekitar $\frac{1}{2}$ dan $\frac{3}{4}$ dibandingkan kelompok KDM ($p < 0,05$). Pemberian EEDGM dosis 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB dan 800 mg/kgBB menurunkan persentase CD8⁺ berturut-turut $\frac{1}{5}$, $\frac{1}{3}$ dan $\frac{1}{10}$ dibandingkan kelompok KDM ($p < 0,05$).

Kesimpulan: Pemberian EEDGM meningkatkan persentase IL-10 dan menurunkan persentase CD8⁺ tikus model diabetes.

Kata Kunci : inflamasi, diabetes, *Abelmoschus manihot* (L.) Medik, 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, Tel. (0341) 558958

**EFFECT ETHANOL EXTRACT OF *Abelmoschus manihot* (L.) Medik ON IL-10 AND CD8⁺
PERCENTAGES IN TYPE II DIABETES MELLITUS RAT MODEL**

Nur Kamilah, Reza Hakim, Yudi Purnomo*

Medical Faculty University of Islam Malang

ABSTRACT

Introduction: Inflammation due to oxidative damage triggered by hyperglycemia contributes to the progression of diabetes mellitus (DM). Interleukin-10 (IL-10) and CD8⁺ affect the inflammatory process. *Abelmoschus manihot* (L.) Medik have been known as anti-inflammatory and antioxidant to reduce inflammation in DM pathophysiology. The aim of this study was to determine the effect of ethanol extract of *Abelmoschus manihot* (L.) Medik in percentages of IL-10 and CD8⁺ in DM rat model.

Method: 6 weeks old *Sprague Dawley* male rats, divided into normal control (KN), diabetes mellitus control (KDM), ethanol extract of *Abelmoschus manihot* (L.) Medik (EEDGM) 200 mg/kgBB, EEDGM 400 mg/kgBB and EEDGM 800 mg/kgBB (n=5). The rats were induced on a high-fat-fructose diet (HFFD) for 10 weeks and STZ low dose 25 mg/kgBB intraperitoneal multiple dose at week 4. Subsequently, EEDGM were given for 4 weeks. IL-10 and CD8⁺ percentages were measured by using flowcytometry. Data analyzed by using One Way ANOVA analysis and LSD ($p < 0,05$).

Result : The induction of HFFD and STZ in KDM decrease IL-10 and increase CD8⁺ percentages. EEDGM 400 mg/kgBB and 800 mg/kgBB decrease IL-10 percentage approximately $\frac{1}{2}$ and $\frac{3}{4}$ compared by KDM ($p < 0,05$). EEDGM 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB and 800 mg/kgBB increase CD8⁺ percentage approximately $\frac{1}{5}$, $\frac{1}{3}$ and $\frac{1}{10}$ compared by KDM ($p < 0,05$).

Conclusion: According to the result above, EEDGM can increase IL-10 and decrease CD8⁺ percentages in diabetic rat model.

Keywords: inflammation, diabetic, *Abelmoschus manihot* (L.) Medik, high fat diet, high fructose diet, streptozotocin
Corresponding author:

Yudi Purnomo

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

email : yudi.purnomo@unisma.ac.id, Tel. (0341) 558958

PENDAHULUAN

Diabetes Melitus (DM) merupakan permasalahan kesehatan di dunia yang terjadi akibat gangguan metabolisme, sehingga timbul Hiperglikemia¹. Pada tahun 2019, jumlah pasien DM di dunia sebanyak 463 juta jiwa dan diprediksi angka tersebut akan meningkat sampai 578 juta jiwa pada tahun 2030 dan 700 juta jiwa pada tahun 2045². Pada tahun 2012 dilaporkan DM menjadi penyebab langsung kematian 1,65 juta jiwa di dunia¹. Prevalensi diabetes melitus pada penduduk dewasa di Indonesia sebesar 6,9% di tahun 2013, dan melonjak pesat ke angka 8,5% di tahun 2018³.

Inflamasi akibat kerusakan oksidatif yang dipicu hiperglikemia berperan terhadap progresivitas DM. Kerusakan oksidatif menginduksi reaksi inflamasi melalui aktivasi *nuclear factor kappa B* (NF- κ B). Faktor transkripsi tersebut memicu aktivasi sel T helper 1 (Th1) dan sel CD 8⁺ yang mengeluarkan IFN- γ untuk mempromosikan polarisasi makrofag 1 (M1) dan meningkatkan fungsi proinflamasi. Pada kondisi awal, sel Th2 juga diaktivasi dan meningkatkan diferensiasi makrofag 2 (M2) yang mensekresi IL-10 sehingga dapat menghambat pengeluaran sitokin pro inflamasi. Interleukin-10 sebagai anti inflamasi juga dihasilkan oleh sel T regulator (T_{reg}). Namun pada DM, IL-10 mengalami penurunan sehingga meningkatkan proses inflamasi dan akan memperparah kondisi resistensi insulin^{4,5,6,7}.

Pemberian oral anti diabetik (OAD) merupakan salah satu terapi diabetes, namun memiliki efek samping yang merugikan^{1,8}. Hal tersebut mendorong untuk dilakukan penelitian menggunakan Daun Gedi Merah (*Abelmoschus manihot* (L.) Medik) sebagai terapi penunjang diabetes. Daun gedi merah sudah dikenal secara turun temurun oleh masyarakat Sulawesi untuk pengobatan sakit ginjal, kencing manis dan kolestrol⁹. Ekstrak daun gedi merah dapat menurunkan persentase glukosa darah pada tikus putih yang diinduksi streptozotocin (STZ) pada dosis 100mg/KgBB¹⁰. Ekstrak daun gedi merah mengandung flavonoid, alkaloid, saponin dan tanin. Flavonoid terutama quercetin memiliki efek anti inflamasi dengan cara menghambat NF- κ B dan meningkatkan sekresi IL-10^{11,12,13}. Quercetin, hyperin dan myricetin memiliki efek antioksidan yang bekerja sebagai *scavenger* radikal hidroksil dan superhidroksil sehingga mampu menghambat produksi ROS intraseluler^{11,14,15}. Hingga saat ini penelitian mengenai efek ekstrak daun gedi merah terhadap IL-10 dan CD8⁺ belum banyak dilakukan.

METODE

Metode yang digunakan eksperimental laboratorium secara *in vivo* dengan *control group post test only design*. Persetujuan etik penelitian dari komite etik penelitian Universitas Brawijaya dengan nomor No. 028-KEP UB tahun 2020.

Tempat penelitian di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran dan Laboratorium Biomolekuler Fakultas MIPA Universitas Brawijaya. Hewan coba yang digunakan tikus jantan galur *sprague dawley*, berat badan \pm 180-200 gram, usia 4-6 minggu. *Sprague dawley* dibagi menjadi kelompok kontrol normal (KN), kelompok kontrol diabetes melitus (KDM), kelompok ekstrak etanol daun gedi merah (EEDGM) 200 mg/kgBB, EEDGM 400 mg/kgBB dan EEDGM 800 mg/kgBB (n=5).

Pembuatan Tikus Model Diabetes Melitus

Tikus di induksi diet tinggi lemak fruktosa (DTLF) dan streptozotocin (STZ). Komposisi DTLF yaitu, air secukupnya, kuning telur (4%), minyak kambing (6,5%), minyak babi (6,5%), asam kolat (0,2 %) , pakan ayam (82,8%) dan campuran fruktosa dengan air, perbandingan 2:10¹⁶. Minggu ke-4 pemberian DTLF di injeksi STZ *low dose* 25 mg/kgBB secara intraperitoneal, 72 jam pasca injeksi diukur kadargula darah puasa (KGDP) dan tikus dinyatakan DM apabila KGDP \geq 126mg/dl¹⁷.

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. 25 gram serbuk daun gedi merah dilarutkan dalam etanol 96% dan diekstraksi menggunakan metode soxhletasi sampai pelarut berwarna bening dan jumlahnya berkurang. Hasil ekstraksi diuapkan dengan *rotary evaporator* untuk mendapatkan bentuk pasta, ditimbang menjadi 200, 400, dan 800 mg/kgBB dan disuspensi dengan CMC-Na 1% sampai homogen¹⁷.

Isolasi Sel Limfosit dari Organ Lien

Hewan coba dikorbankan dengan injeksi ketamin 0,2 ml intramuskuler, kemudian tikus dibedah untuk diambil organ lien. Lien dicuci dengan *phospat buffer saline* (PBS) steril 2-3 kali, dan dimasukkan dalam cawan petri berbeda yang berisi 5 ml PBS dan digerus menggunakan pangkal spuit searah jarum jam. Organ yang telah digerus, kemudian disaring dengan *wire*, dimasukkan dalam tabung propilen 15 ml, dan diberi PBS \pm 5 ml pada saringan sel. Kemudian disentrifus pada kecepatan 2500 rpm, 5 menit, dengan suhu 10 derajat. Supernatan dibuang dan pelet sel yang terbentuk diresuspensi dengan PBS 1ml, dimasukkan ke micro tube 1,5 ml yang telah berisi \pm 0,5 ml PBS dan disentrifus kembali. Setelah disentrifus, supernatan dibuang hingga tinggal pelet, setelah itu siap dilakukan perwarnaan¹⁸.

Analisis Sel IL-10 dan CD8⁺ Menggunakan Flowcytometry

Sel limfosit yang telah diisolasi dilakukan pewarnaan secara ekstraseluler dan intraseluler.

Pewarnaan ekstraseluler dilakukan dengan menambahkan larutan *antibody monoklonal phycoeritrin (PE) conjugated rat anti-mouse CD8* yang telah diencerkan dengan 50 µl PBS dan 10 % fetal bovine serum (FBS) pada pelet. Pelet yang sudah dilakukan pewarnaan di inkubasi pada suhu 4°C, di ruang gelap selama 20 menit. Selanjutnya ditambahkan *fixation buffer* (cat.#420801 [Biolegend]) sebanyak 50 µl dan diinkubasi selama 20 menit, suhu 4°C pada ruang gelap¹⁸.

Tambahkan larutan *Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer* (10X) (cat.#421002 [Biolegend]) sebanyak 500 µl, dihomogenisasi, disentrifus kembali dan supernatan dibuang. Tambahkan 50 µl larutan antibodi spesifik *PerCP/Cyanine5.5 anti-mouse IL-10 Antibody* pada pelet dan diinkubasi seperti sebelumnya.

Setelah diinkubasi, tambahkan 400µl PBS masukkan dalam tabung kuvet pada *flowcytometry* dengan mikropipet. Kuvet dipasang pada *nozzle BD Biosciences FACSCalibur™flowcytometry*. Hasil siap untuk dibaca dengan *flowcytometry*¹⁸.

Analisa Data

Data dianalisis menggunakan *software BD cellquest PRO™* kemudian ditabulasi menggunakan Microsoft excel dan di analisa statistik. Analisa statistik menggunakan *one way ANOVA* dan dilanjutkan uji *least significance different* (LSD) dengan $p < 0.05$. Analisa data dilakukan dengan memakai 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 awal (g)	242.8 ± 12.7 ^a	230.4 ± 11.5 ^a	246.8 ± 18.9 ^a	256.2 ± 32.20 ^a	253.0 ± 25.08 ^a
BB akhir (g)	335.4 ± 34.9 ^a	279.2 ± 54.0 ^b	304.80 ± 52.0 ^c	324.8 ± 24.1 ^c	333.6 ± 28.8 ^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 ^a	84,8 ± 7,7 ^a	77,6 ± 15,1 ^a	86,4 ± 9,21 ^a	81,6 ± 12,2 ^a
KGDP awal (mg/dL)	74.6 ± 3.0 ^a	85.0 ± 8.5 ^b	83.2 ± 5.3 ^b	87.6 ± 3.9 ^b	81.6 ± 3.2 ^b
KGDP pra perlakuan (mg/dL)	100.0 ± 7.9 ^a	182.6 ± 43.1 ^b	171.6 ± 11.6 ^b	172.2 ± 26.6 ^b	163.6 ± 9.9 ^b
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
Δ KGDP (mg/dl)	11.6 ± 13.7	32.8 ± 34.3	41.0 ± 9.7	51.4 ± 33.0	49.8 ± 6.2

Keterangan:

Data dalam mean ± SD. Uji statistik menggunakan *One Way Anova* dan *Post Hoc LSD test*, BB: Berat Badan, BB awal: BB sebelum diberikan induksi DTLF dan STZ, BB akhir: BB setelah diberikan EEDGM, Δ BB: selisih BB awal dan akhir, KGDP : Kadar Glukosa Darah Puasa, KGDP pra perlakuan: KGDP yang diukur setelah induksi DTLF dan STZ, KGDP pasca perlakuan: KGDP yang diukur setelah pemberian EEDGM, Δ KGDP: selisih KGDP pra dan pasca perlakuan, KN: Kontrol Negatif, KDM: Kontrol Diabetes Melitus, EEDGM: pemberian ekstrak etanol daun gedi merah. Notasi yang berbeda antar perlakuan menunjukkan signifikansi ($p < 0.05$).

Berdasarkan tabel 1, berat badan (BB) awal antar kelompok tidak terdapat perbedaan yang signifikan ($p > 0.05$). BB akhir KDM lebih rendah dibandingkan KN ($p < 0.05$). BB akhir kelompok EEDGM 200mg/kgBB, 400mg/kgBB dan 800mg/kgBB meningkat dibandingkan KDM ($p < 0.05$). Asupan pakan pada kelompok KDM lebih rendah dibandingkan kelompok KN.

Kadar glukosa darah puasa (KGDP) pra perlakuan KDM dan EEDGM lebih tinggi dibandingkan KN ($p < 0.05$). Kadar glukosa darah puasa (KGDP) pasca perlakuan pada kelompok EEDGM lebih rendah dibandingkan kelompok KDM ($p < 0.05$).

Persentase IL-10 Tikus Model Diabetes yang Diberi Ekstrak Etanol Daun Gedi Merah

Efek Ekstrak Etanol Daun Gedi Merah (*Abelmoschus manihot (L.) Medik*) terhadap persentase IL-10 tikus model diabetes dapat dilihat

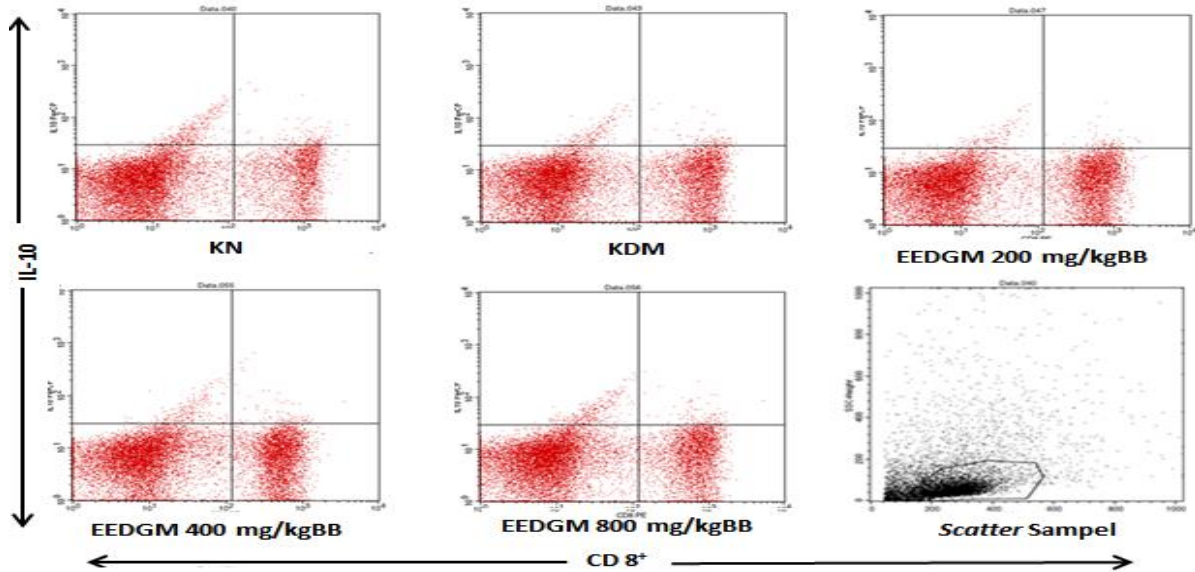
pada gambar 1 dan 2. Persentase IL-10 KDM turun secara signifikan sekitar ½ kali dibandingkan KN ($p < 0.05$). Pemberian EEDGM dosis 400mg/kgBB dan 800mg/kgBB signifikan meningkatkan persentase IL-10 berturut-turut sekitar ½ kali dan ¾ kali dibandingkan KDM ($p < 0.05$), sedangkan dosis 200mg/kgBB tidak berbeda signifikan dalam meningkatkan persentase IL-10 dibandingkan KDM ($p > 0.05$). Pemberian EEDGM dosis 400mg/kgBB dan 800mg/kgBB tidak berbeda signifikan dalam meningkatkan persentase IL-10 ($p > 0.05$).

Ekstrak Etanol Daun Gedi Merah terhadap Persentase CD8⁺ Tikus Model Diabetes

Efek Ekstrak Etanol Daun Gedi Merah (*Abelmoschus manihot (L.) Medik*) terhadap persentase CD8⁺ tikus model diabetes dapat dilihat pada gambar 1 dan 3. Induksi DM dengan pemberian DTLF dan STZ meningkatkan

persentase CD8⁺ secara signifikan sekitar 1/2 kali dibandingkan KN ($p < 0.05$). Pemberian EEDGM dosis 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB dan 800 mg/kgBB secara signifikan menurunkan persentase CD8⁺ tikus model diabetes berturut-turut sekitar

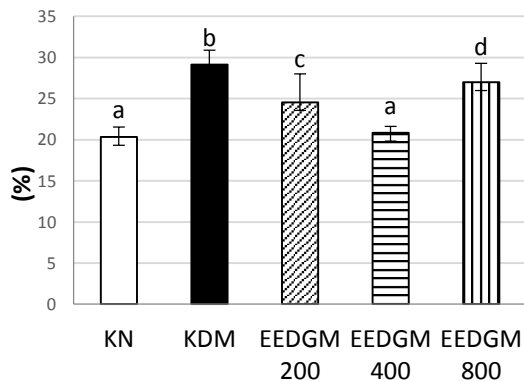
1/5, 1/3 dan 1/10 kali dibandingkan KDM ($p < 0.05$). Pemberian EEDGM dosis 400mg/kgBB menurunkan persentase CD8⁺ hingga tidak berbeda dibandingkan KN ($p > 0.05$).



Gambar 1. Flowcytometry Persentase IL-10 dan CD8⁺

Keterangan:

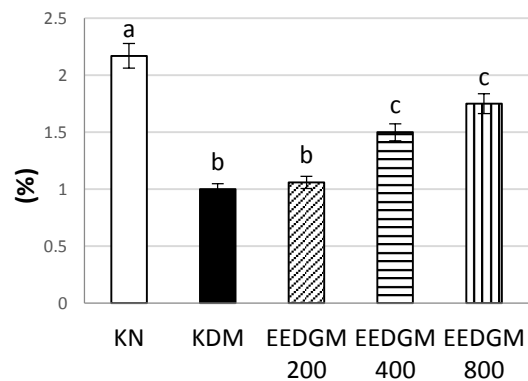
KN: Kontrol Negatif, KDM: Kontrol Diabetes Melitus, EEDGM 200,400,800: pemberian ekstrak etanol daun gedi merah dosis 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB dan 800 mg/kgBB. Scatter Sampel menunjukkan jumlah limfosit T.



Gambar 2. Histogram persentase IL-10 tikus model diabetes yang telah diberikan ekstrak etanol daun gedi merah

Keterangan:

Data dalam mean ± 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)



Gambar 3. Histogram persentase CD8⁺ tikus model diabetes yang telah diberikan ekstrak etanol daun gedi merah

Keterangan:

Data dalam mean ± 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)

PEMBAHASAN

Karakteristik Sampel

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus jantan galur *Sparague dawley* dengan usia 4-6 minggu dan berat badan ± 180-200 gram. Tikus jenis ini digunakan karena mudah beradaptasi, tidak mudah stress dan mudah diberi perlakuan¹⁹. Tikus jantan dari galur ini dipilih untuk penelitian karena

galur ini memiliki struktur DNA mirip dengan manusia²⁰.

Berat badan(BB) akhir kelompok KDM menunjukkan BB lebih rendah dan berbeda signifikan dengan KN. Hal ini disebabkan karena induksi DTLF dan STZ memicu terjadinya resistensi insulin dan penurunan sekresi insulin.

Resistensi insulin dan penurunan sekresi insulin menyebabkan glukosa tidak dapat dimasukkan ke dalam sel dan jaringan, sehingga untuk mendapatkan energi perlu dilakukan lipolisis. Lipolisis menyebabkan terjadinya penurunan berat badan. Pada BB akhir kelompok EEDGM lebih tinggi dibandingkan KN. Hal ini dikarenakan EEDGM memiliki kandungan flavonoid dan alkaloid yang mampu memperbaiki resistensi insulin dan meningkatkan sekresi insulin. Mekanisme ini menyebabkan lipolisis dihambat dan terjadi peningkatan berat badan^{11,21}.

Asupan pakan pada kelompok KDM lebih rendah dibandingkan kelompok KN. Hal tersebut diduga karena pada kelompok KDM asupan pakan mengandung tinggi lemak, dimana lemak kepadatan kalorinya tinggi dan tingkat penyerapannya relatif lebih lambat dibanding makronutrien lain. Hal ini menyebabkan pengosongan lambung lebih lama dan asupan pakan menjadi turun²².

Kadar glukosa darah puasa (KGDP) pra perlakuan kelompok KDM dan EEDGM lebih tinggi dibandingkan KN. Hal ini disebabkan karena induksi DTLF dan STZ menyebabkan terjadinya resistensi insulin dan kerusakan sel β pankreas yang memicu terjadinya hiperglikemia. KGDP pasca perlakuan pada kelompok EEDGM lebih rendah dibandingkan kelompok KDM. Hal ini disebabkan daun gedi merah memiliki senyawa flavonoid yang memiliki efek untuk meningkatkan sensitivitas insulin dan alkaloid yang berperan sebagai regenerasi sel β pankreas. Keduanya ini dapat meningkatkan *uptake* glukosa, sehingga KGDP menurun^{11,21,23}.

Efek Pemberian DTLF dan STZ terhadap Persentase IL-10 dan Sel CD8⁺

Pada kelompok KDM didapatkan penurunan persentase IL-10 dan peningkatan CD8⁺ secara signifikan dibandingkan KN. Induksi DTLF dalam waktu yang lama menyebabkan terjadinya resistensi insulin. Hal ini dikarenakan akumulasi lipid dalam adiposit dapat meningkatkan produksi sitokin proinflamasi seperti tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) dan interleukin-6 (IL-6). Kedua sitokin pro inflamasi ini yang menyebabkan terjadinya resistensi insulin^{24,25}. TNF- α menyebabkan resistensi insulin dengan meningkatkan lipolisis adiposit yang merangsang jalur c-Jun N-terminal kinase (JNK) dan *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) yang dapat meningkatkan fosforilasi serin/ treonin dari insulin reseptor substrat (IRS-1). IL-6 menginduksi resistensi insulin dengan mengurangi ekspresi GLUT4 dan IRS-1 dengan mengaktifkan jalur pensinyalan JAK-STAT dan meningkatkan ekspresi SOCS3. IL-6 juga dapat menyebabkan resistensi insulin pada otot rangka dengan menginduksi ekspresi gen TLR-4 melalui aktivasi STAT3^{26,27}.

Pemberian streptozocin (STZ) mengakibatkan kerusakan sel β pankreas sehingga menurunkan sintesis dan sekresi insulin. STZ

memiliki sifat alkilasi DNA yang mengakibatkan kerusakan sel β pankreas dan akhirnya terjadi penurunan sekresi insulin^{28,29}. Resistensi insulin dan penurunan sekresi insulin menyebabkan terjadinya hiperglikemia³⁰.

Hiperglikemia kronis yang terus berlanjut akan menurunkan interleukin-10 (IL-10). IL-10 merupakan sitokin antiinflamasi yang disekresikan oleh makrofag 2 (M₂) yang dipolarisasi dengan cara aktivasi dari sel Th₂. Sel T regulator (T_{reg}) juga mengeluarkan IL-10 saat proses inflamasi terjadi. IL-10 merupakan salah satu sitokin yang berperan pada proses inflamasi, yaitu sebagai antiinflamasi yang mampu menekan pengeluaran sitokin-sitokin proinflamasi^{6,7}. Berkurangnya persentase IL-10 pada patofisiologi DM, mengakibatkan peningkatan CD8⁺⁵.

Hiperglikemia kronis juga akan menyebabkan peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) sehingga terjadi kerusakan oksidatif. Kerusakan oksidatif memicu terjadinya inflamasi di sel maupun jaringan melalui aktivasi faktor transkripsi NF- κ B yang meningkatkan CD8⁺^{4,8}. CD8⁺ merupakan proinflamasi dari limfosit T yang disintesis oleh timus³¹. CD8⁺ dapat meningkatkan fungsi proinflamasi dengan mengeluarkan IFN- γ sehingga mempromosikan polarisasi makrofag 1 (M1) dan meningkatkan fungsi proinflamasi dengan menginduksi pelepasan IL-1, IL-6 dan TNF- α ^{6,29}. Peningkatan sitokin-sitokin proinflamasi ini mengakibatkan inflamasi terus berlanjut dan akan memperparah keadaan resistensi insulin⁵.

Pada penelitian pembuatan tikus model DM ini tidak dilakukan uji resistensi insulin menggunakan *Homeostatic Model Assasment-Insulin Resistance* (HOMA-IR). HOMA-IR merupakan salah satu uji yang berfungsi untuk mendeteksi resistensi insulin. Uji ini diperlukan untuk memastikan bahwa hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini sudah mengalami resistensi insulin.

Efek Ekstrak Etanol Daun Gedi Merah terhadap Persentase IL-10 Tikus Model Diabetes

Pemberian ekstrak etanol daun gedi merah dapat meningkatkan persentase IL-10 tikus model diabetes. Efek tersebut diduga berhubungan dengan zat aktif quercetin sebagai antiinflamasi yang terdapat pada ekstrak etanol daun gedi merah³². Comalada (2006) menjelaskan quercetin dapat merangsang sekresi IL-10, hal ini mungkin dikarenakan efek pasca transkripsi di makrofag¹³. IL-10 dapat menghambat sintesis sitokin pro inflamasi seperti TNF- α , IL-6 dan aktivitas biologisnya pada sel target³³. Pada penelitian sebelumnya, IL-10 terbukti meningkatkan fungsi sel β pankreas dalam menanggapi glukosa secara *in vitro*, dan pengobatan menggunakan IL-10 secara signifikan mengurangi insulinitis dan mencegah progresivitas pada tikus diabetes *nonobese*³⁴. IL-10 juga dilaporkan mempengaruhi metabolisme

glukosa perifer dan bahwa pengobatan dengan IL-10 dapat mengurangi resistensi insulin^{35,36}.

Mekanisme secara tidak langsung dalam meningkatkan sekresi IL-10 yaitu yaitu mekanisme antihiperqlikemi dari ekstrak etanol daun gedi merah. Hal ini diduga berhubungan dengan kandungan zat aktif alkaloid, saponin dan tanin dari daun gedi merah^{11,37,38}. Alkaloid dapat meningkatkan jumlah insulin dengan meregenerasi sel β pankreas yang mengalami kerusakan. Saponin bekerja dengan cara menghambat enzim α -glukosidase, yaitu enzim yang mengubah karbohidrat menjadi glukosa sehingga penyerapan glukosa berkurang¹¹. Sedangkan tanin berfungsi sebagai astrigen yang dapat membentuk lapisan protein pada usus dan mengerutkan membran epitel usus halus sehingga menurunkan penyerapan sari makanan termasuk glukosa³⁹. Potensi antihiperqlikemi dari daun gedi merah ini terbukti dengan penurunan KGDP pasca perlakuan. Penurunan kadar glukosa darah ini diduga dapat memperbaiki M_2 dan sel T_{reg} sehingga sekresi IL-10 meningkat.

Pada penelitian ini, pemberian EEDGM dosis 400 mg/kgBB dan 800 mg/kgBB tidak berbeda signifikan dalam meningkatkan persentase IL-10 dan didapatkan kesan *non-dependent dose*. Hal ini diduga karena ekstrak etanol daun gedi merah yang diberikan merupakan ekstrak kasar sehingga dalam ekstrak terdapat senyawa multikomponen dan multi aksi. Oleh karena itu, peningkatan pemberian dosis tidak menunjukkan perbedaan efek yang signifikan¹¹.

Persentase IL-10 pada kelompok pemberian EEDGM 200 mg/kgBB tidak berbeda signifikan dengan KDM. Hal ini dapat disebabkan oleh durasi pemberian ekstrak yang relatif singkat maupun dosis ekstrak yang kurang sehingga dapat mempengaruhi dari kerja senyawa aktif untuk mencapai reseptor dan memberikan efek dalam meningkatkan persentase IL-10^{10,13}. Hal ini didukung oleh penelitian Fitriyah (2020), yang menyatakan bahwa EEDGM 200 mg/kgBB tidak menunjukkan hasil yang signifikan dalam menurunkan kadar TNF- α pada jaringan aorta⁴⁰. Peningkatan kadar TNF- α ini berhubungan dengan penurunan IL-10 sehingga tidak dapat menekan sekresi TNF- α .

Efek Ekstrak Etanol Daun Gedi Merah terhadap Persentase Sel CD8⁺ Tikus Model Diabetes

Pemberian EEDGM dapat menurunkan persentase CD8⁺ pada tikus model diabetes. Hal ini diduga karena adanya kandungan zat aktif yang berperan sebagai antiinflamasi. 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 CD8⁺ dan menghambat pengeluaran sitokin-sitokin pro inflamasi yang dikeluarkan oleh M_1 ¹².

Mekanisme secara tidak langsung dalam menurunkan persentase CD8⁺ yaitu mekanisme antioksidan dari ekstrak daun gedi merah. Hal ini diduga berhubungan dengan quercetin, hyperin dan myricetin sebagai antioksidan yang bekerja sebagai *scavenger* radikal hidroksil dan superhidroksil sehingga mampu menghambat produksi ROS intraseluler^{11,14,15}. Penurunan produksi ROS dapat mencegah kerusakan oksidatif pada jaringan sehingga tidak memicu terjadinya inflamasi dan pengeluaran sitokin pro inflamasi seperti CD8⁺.

Kandungan zat aktif lainnya dari daun gedi merah yaitu alkaloid, saponin dan tanin yang dapat menurunkan kadar gula darah. Seperti telah dijelaskan sebelumnya efek alkaloid, saponin dan tanin dapat menurunkan kadar gula darah sehingga tidak terjadi inflamasi akibat kerusakan oksidatif. Hal ini dapat menurunkan persentase CD8⁺^{11,37,38}.

Dosis 400 mg/kgBB paling kuat dalam menurunkan CD8⁺ karena tidak berbeda signifikan dengan kelompok normal. Hal ini diduga karena ekstrak etanol daun gedi merah pada dosis tersebut memiliki efek antiinflamasi yang cukup kuat sehingga dapat menurunkan CD8⁺ pada tikus model diabetes. Hal ini didukung oleh penelitian Fitriyah (2020), yang menyatakan pada dosis EEDGM 400mg/kgBB paling kuat dalam menurunkan kadar TNF- α pada jaringan aorta⁴⁰. Penurunan kadar TNF- α ini berhubungan dengan penurunan CD8⁺ sehingga kemampuan M_2 untuk sekresi TNF- α berkurang.

Kemampuan EEDGM 800mg/kgBB dalam menurunkan CD8⁺ lebih rendah dibandingkan dosis lain. Hal ini mungkin karena pada dosis 800 mg/kgBB, sebagian kandungan flavonoid menjadi prooksidan. Flavonoid diketahui mengandung cincin fenol B yang dapat mengalami oksidasi dan bergantung pada glutathione jika tidak ada logam transisi sehingga menjadi radikal bebas^{41,42}. Mekanisme ini menyebabkan kemampuan flavonoid menurunkan CD8⁺ berkurang⁴³. Hal ini didukung oleh Nurasidah 2020 (*unpublish*) yang menyatakan pemberian EEDGM 800mg/kgBB paling rendah dalam menghambat peningkatan nekrosis sel epitel glomerulus. Jumlah nekrosis sel epitel glomerulus yang tinggi menunjukkan tingginya jumlah sitokin proinflamasi termasuk CD8⁺.

Kekurangan pada penelitian ini yaitu tidak dilakukan pengukuran M_2 dan sel T_{reg} yang merupakan aktivator IL-10. Hal ini diperlukan untuk melihat efek ekstrak etanol daun gedi merah terhadap aktivitas M_2 dan sel T_{reg} dalam sekresi IL-10. Selain itu, perlu dilakukan penelitian terhadap sitokin proinflamasi yang diaktivasi oleh CD8⁺.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian dan pembahasan di atas maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Induksi DTLF dan STZ dapat menurunkan persentase IL-10 dan meningkatkan persentase CD8⁺.
2. Pemberian ekstrak etanol daun gedi merah dapat meningkatkan persentase IL-10 dan menurunkan persentase CD8⁺.

SARAN

Berdasarkan hasil penelitian ini, maka untuk penelitian lanjutan perlu dilakukan :

1. Penelitian mengenai HOMA-IR untuk memastikan terjadinya resistensi insulin pada tikus model diabetes.
2. Penelitian mengenai efek EEDGM terhadap aktivitas M₂ dan sel T_{reg} dalam sekresi IL-10.
3. Penelitian mengenai sitokin-sitokin proinflamasi yang diaktivasi oleh CD8⁺.

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. World Health Organization. Global report on diabetes. 2016. Geneva: **World Health Organization**.
2. Williams,R., Colagiuri,S., Almutairi,R., Montoya,P.A., Basit,A., Beran,D., Besançon,S., Bommer,C., Borgnakke, W., Boyko, E., Bright,D., Chan,J., Dahlquist, G *et al.*, 2019. IDF Diabetes Atlas. **International Diabetes Atlas**. United Kingdom.
3. Kemenkes RI (Kementrian kesehatan RI), Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. 2018. Hasil Utama RISKESDAS. **Kemenkes**. Jakarta Selatan
4. Setiawan B, Suhartono E. Stres Oksidatif dan Peran Antioksidan pada Diabetes Melitus. *Maj Kedokt Indon*. 2005; 55(2): 86-91
5. Harford K. A., Reynolds C. M., McGillicuddy F. C., Roche H. M. Fats, inflammation and insulin resistance: insights to the role of macrophage and T-cell accumulation in adipose tissue. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2011; 70(4): 408–17.
6. Lumeng C. N., Bodzin J. L., Saltiel A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *Journal of Clinical Investigation*. 2007; 117(1): 175–84.
7. Winer, S., Chan, Y., Paltser, G., Truong, D., Tsui, H., Bahrami, J., Dorfman, R., Wang, Y., Zielenski, J., Mastronardi, F., Maezawa, Y., Drucker, D.J., Engleman, E., Winer, D and Dosch, H.M. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immuno-therapy. *Nature Medicine*. 2009; 15 (8): 921–9.
8. Soelistijo S.A., Novida H., Rudijanto A., Soewondo P., Suastika K., Manaf A., Sanusi H., Lindarto D., Shahab A., Pramono B., Langi Y.A. *et al.* 2015. Pengelolaan dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 di Indonesia. Jakarta: **PERKENI**.
9. Mamahit, Lexi. Eikodekana Dari Daun Tumbuhan Gedi (*Abelmoschus manihot* L) Asal Sulawesi Utara. Manado. *Chem.Prog*. 201; 2(2): 122-5
10. Nobertson, R., Indah, N, P., & Kenta, Y. S. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Gedi Merah (*Abelmoschus manihot* (L.)). Palu Sulawesi Tengah. *Farmokologika: Jurnal Farmasi*. 2018; 15(1): 63-71.
11. Tandji, J., Muthi'ah, H. Z., Yuliet, Y., & Yusriadi, Y. Efektivitas Ekstrak Daun Gedi Merah Terhadap Glukosa Darah, Malondialdehid, 8-Hidroksi- Deoksiguanosin, Insulin Tikus Diabetes. *Journal Of Tropical Pharmacy And Chemistry*. 2016: 3(4): 264-76.
12. Leyva López, N., Gutierrez Grijalva, E. P., Ambriz-Perez, D. L., & Heredia, J. B. Flavonoids as Cytokine Modulators: A Possible Therapy for Inflammation Related Diseases. *International journal of molecular sciences*. 2016; 17(6): 921.
13. Comalada, M., Ballester, I., Bailón, E., Sierra, S., Xaus, J., Gálvez, J., de Medina, F. S., & Zarzuelo, A. Inhibition of proinflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure-activity relationship. *Biochemicalpharmacology*. 2006; 72(8): 1010–21.
14. Lee, D.Y., Shrestha,S., Seo, W.D., Lee, M.H., Jeong, T.S., Cho,Y.C., Song, J.H., Kang, H.W., Rho, Y.D., Baek, N.I. Structural and quantitative analysis of antioxidant and low-density lipoprotein-antioxidant flavonoids from the grains of sugary rice. *J. Med. Food*. 15: 399-405
15. Barzegar A. 2016. Antioxidant activity of polyphenolic myricetin in vitro cell-free and cell-based systems. *Mole Biol Res Commun*. 5(2):87.
16. Murwani, Sri; Ali, Mulyohadi; Muliarta, Ketut. Diet atherogenik pada tikus putih (*Rattus norvegicus* strain Wistar) sebagai model hewan aterosklerosis. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 2013; 22(1): 6-9.
17. Xiang X, Wang Z, Zhu Y, Bian L, Yang Y. Dosage Of Streptozocin In Inducing Rat Model Of Type 2 Diabetes Melitus. *Journal of hygiene research*. 2010; 39(2):138-42.
18. Dwijayanti D.R., Djati M.S., Ibrahim M and Rifa'i M. The Potential of VipAlbumin to Chronic Inflammation in Type 2 Diabetes

- Melitus Balb/C Mice Model. *American Journal of Immunology*. 2015;11 (2): 56-67
19. Kartika N. 2012. Pengaruh Pemberian Minyak Zaitun Ekstra Virgin Terhadap Profil Lipid Tikus Putih Norvegicus) Strain Sprague Dawley Hiperkolesterolemia. Doctoral dissertation, **Diponegoro University**.
 20. Kumar, V., & Cotrann, R. S. 2012. Robbins Buku Ajar Patologi Edisi 7. Jakarta: **EGC**.
 21. Boden, G., dan Laakso, M. Lipids And Glucose In Type 2 Diabetes: What Is The Cause And Effect?. *Diabetes Care*. 2004; 27(9): 2253-59.
 22. Gentilcore, D., Chaikomin, R., Jones, K. L., Russo, A., Feinle-Bisset, C., Wishart, J. M., and Horowitz, M. Effects of fat on gastric emptying of and the glycemic, insulin, and incretin responses to a carbohydrate meal in type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2006; 91(6): 2062-7.
 23. Nugroho, A. E. Hewan Percobaan Diabetes Melitus: Patologi Dan Mekanisme Aksi Diabetogenik. *Biodiversitas*. 2006; 7(4): 378-382.
 24. Shoelson, S. E. Lee, J. Goldfine, A. B. Inflammation and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*. 2006; 116(7): 1793–801.
 25. Hotamisligil, G. S. Molecular mechanisms of insulin resistance and the role of the adipocyte. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*. 2000; 24(4) S23–S27.
 26. Kahn, S. E. Hull, R. L. Utzschneider, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 2006; 444(7121): 840–6.
 27. Zhou, X. dan You, S. Rosiglitazone inhibits hepatic insulin resistance induced by chronic pancreatitis and IKK- β /NF- κ B expression in liver. *Pancreas*. 2014; 43(8): 1291–8.
 28. Lenzen, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2007; 51(2): 216-26.
 29. Ghasemi, Asghar; Khalifi, S.; Jedi, S. Streptozotocin -nicotinamide- induced rat model of type 2 diabetes. *Acta Physiologica Hungarica*. 2001; 101(4): 408-20.
 30. Mercedes, Agustina. Aktivitas Antidiabetes Kombinasi Ekstrak Daun Gedi Merah Dan Daun Semak Bunga Putih Tikus Induksi Streptozotocin. *Farmakologika: Jurnal Farmasi*. 2017; 14(2): 159-66.
 31. Dranoff, G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2004; 4(1): 11–22.
 32. Wu, L. L., Yang, X. B., Huang, Z. M., Liu, H. Z., and Wu, G. X. In vivo and in vitro antiviral activity of hyperoside extracted from *Abelmoschus manihot* (L.) medik. *Acta pharmacologica Sinica*. 2007; 28(3): 404–9.
 33. Waris, Risda; Am, Esti Dewi Pratiwi; Najib, Ahmad. 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.
 34. Akdis CA, Blaser K. Mechanisms of interleukin -10- mediated immune suppression. *Immunology*. 2001;103: 131–6.
 35. Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB: Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol.* 2004; 22: 929-79.
 36. Pennline KJ, Roque-Gaffney E, Monahan M: Recombinant human IL-10 prevents the onset of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *Clin Immunol Immunopathol*. 1994; 71:169-75
 37. Hong, E. G., Ko, H. J., Cho, Y. R., Kim, H. J., Ma, Z., Yu, T. Y., Friedline, R. H., Kurt-Jones, E., Finberg, R., Fischer, M. A., Granger, E. L., Norbury, C. C., Hauschka, S. D., Philbrick, W. M., Lee, C. G., Elias, J. A., & Kim, J. K. Interleukin-10 prevents diet-induced insulin resistance by attenuating macrophages and cytokine response in skeletal muscle. *Diabetes*. 2009; 58(11): 2525–35.
 38. Weisberg S. P., McCann D., Desai M., Rosenbaum M., Leibel R. L., Ferrante A. W., Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*. 2003; 112(12): 1796–808.
 39. Dewantara, I., Gunawan, I. and Wirajana, I., Uji potensi ekstrak etanol daun gedi (*Abelmoschus Manihot* L.) Terhadap aktivitas antioksidan dan penurunan persentase glukosa darah tikus putih galur wistar yang diinduksi aloksan. *Cakra Kimia*. 2017; 5(2).
 40. Fitriyah, N. Y. A., Amalia, Y., dan Purnomo, Y. Efek Ekstrak Etanol Daun Gedi Merah (*Abelmoschus manihot* (L.) Medik) terhadap Kadar TNF- α Jaringan dan Diameter Lumen Aorta Tikus Model Diabetes Melitus. *Jurnal Kedokteran Komunitas*. 2020; 8(2): 140-6.
 41. Chan, T. Galati, G. O'Brien, P. J. Oxygen activation during peroxidase catalyzed metabolism of flavones or flavanones. *Chem.-Biol. Interact*. 1999;122(1):15-25.
 42. Galati, G. Chan, T. Wu, B. O'Brien, P. J. Glutathione-dependent generation of reactive oxygen species by the peroxidasecatalyzed redox cycling of flavonoids. *Chem. Res. Toxicol*. 1999; 12(6):521–525.
 43. Skibola, Christine F dan Martyn T.Smith. Potential Health Impacts of Excessive Flavonoid Intake. *Free Radical Biology & Medicine*. 2000; 29: 375-83.