

Kertas Asli/Original Article

Kesan Ekstrak Akueus *Hibiscus sabdariffa* Linn. terhadap Tekanan Oksidatif dan Populasi Limfosit T dalam Limpa Tikus Diabetes Aruhan Streptozotosin
(Effects of *Hibiscus sabdariffa* Linn. Aqueous Extract on Oxidative Stress and T Lymphocyte Population in Spleen of Streptozotocin-induced Diabetic Rats)

NOR MALIA ABD WARIF, ASYRAF AKMAL AYOB, WAN MARAHAINI WAN RAZALI, SITI BALKIS BUDIN, SATIRAH ZAINALABIDIN & JAMALUDIN MOHAMED

ABSTRAK

Gangguan sistem imun menyumbang kepada keadaan infeksi yang serius di kalangan pesakit diabetes. Buah *Hibiscus sabdariffa* Linn. (rosel) telah dibuktikan secara saintifik memiliki sifat antioksidan, antidiabetes dan antiinflamasi. Penyelidikan ini dijalankan untuk mengkaji kesan ekstrak akueus buah *H. sabdariffa* terhadap tekanan oksidatif dan populasi limfosit T limpa pada tikus diabetes aruhan streptozotosin (STZ). Tikus jantan Sprague-Dawley disuntik dengan 45 mg/kg STZ untuk merangsang keadaan diabetik dan seterusnya diberi rawatan 100 mg/kg ekstrak akueus buah *H. sabdariffa* setiap hari selama 28 hari. Limpa diambil untuk pengukuran penanda tekanan oksidatif dan penentuan peratus limfosit T CD3+CD4+ dan CD3+CD8+. Hasil kajian menunjukkan pengurangan yang signifikan ($p < 0.05$) dalam bilangan sel limpa dan berat limpa untuk kumpulan tikus diabetes berbanding kumpulan kawalan. Namun, tiada perubahan yang signifikan ($p > 0.05$) dicatatkan pada aras malondialdehid (MDA), aras aktiviti enzim superoksida dismutase (SOD), aras protein karbonil, bilangan limfosit T CD3+ CD4+ dan CD3+ CD8+ limpa pada semua kumpulan kajian. Selain itu, pemerhatian histologi menunjukkan tiada perubahan patologi limpa berlaku pada kumpulan tikus diabetes. Hasil kajian ini menunjukkan bahawa ekstrak akueus buah *H. sabdariffa* tidak memberi kesan ke atas tekanan oksidatif dan peratus limfosit T CD3+CD4+ dan CD3+CD8+ dalam limpa tikus diabetes.

Kata Kunci: Diabetes mellitus, *H. sabdariffa*, limpa, tekanan oksidatif, limfosit T

ABSTRACT

Disturbances in immune system contribute to chronic infection among diabetic patients. *Hibiscus sabdariffa* L. (roselle) fruit extract has been scientifically proven to possess antioxidant, antidiabetic and antiinflammatory properties. The aim of this study was to investigate the effects of *H. sabdariffa* fruit extract against oxidative stress parameter and T lymphocyte population in spleen of streptozotocin (STZ) induced diabetic rats. Male Sprague-Dawley rats were injected with 45 mg/kg STZ to induce diabetic condition and further treated with 100 mg/kg *H. sabdariffa* fruit aqueous extract daily for 28 days. Spleen was harvested to determine the oxidative stress indicators and quantification of T lymphocytes. The results showed a significant decreased in the number of spleen cells and spleen weight in the diabetic rats compared with control rats. However, there were no significant changes in the level of malondialdehyde (MDA), protein carbonyl and superoxide dismutase (SOD) activity the percentage of spleen CD3+ CD4+ and CD3+ CD8+ T lymphocytes amongst groups of study. In addition, histology observation showed no pathological alteration in spleen histology of diabetic rats. The findings suggested that aqueous extract of *H. Sabdariffa* fruit supplementation has no effect on the oxidative stress and the percentage of CD3+ CD4+ and CD3+ CD8+ T lymphocytes in spleen of diabetic rats.

Keywords: Diabetes, *H. sabdariffa*, spleen, oxidative stress, T lymphocytes

PENGENALAN

Diabetes mellitus adalah penyakit metabolik yang dicirikan dengan hiperglisemia kronik disebabkan kekurangan rembesan insulin atau kekurangan reseptor yang sensitif terhadap insulin endogenus (Rolo & Palmeira 2006). Hiperglisemia yang berlaku secara berterusan diketahui akan meningkatkan penghasilan radikal bebas terutamanya spesies oksigen reaktif (*reactive oxygen species*; ROS) yang terhasil melalui proses autooksidasi glukosa dan glikosilasi

protein (Rahimi et al. 2005). Kehadiran ROS yang tinggi dalam tubuh juga menyumbang kepada tekanan oksidatif secara tindak balas berantai dan ianya akan memburukkan lagi keadaan dalam pesakit diabetes (Robertson & Harmon 2006).

Keadaan hiperglisemia dapat meningkatkan virulen mikroorganisma tertentu (Geerlings & Hoepelman 1999) dan berisiko tinggi untuk mendapat infeksi pada saluran respiratori bawah, saluran urinari, kulit dan membran mukus (Muller et al. 2005). Kajian terdahulu juga

menyatakan bahawa keadaan hiperglisemia adalah salah satu perantara yang berpotensi menyebabkan gangguan sistem imun (Geerlings & Hoepelman 1999). Kajian *in vitro* oleh Rubinstein dan rakan-rakan (2008) juga menunjukkan kesan keadaan hiperglisemia ke atas limfosit T di mana jumlah proliferasi serta bilangan limfosit T yang hidup adalah berkurangan dan berlaku peningkatan proses apoptosis limfosit T. Pengurangan proliferasi sel limfosit T CD4+ juga turut dinyatakan oleh Eibl dan rakan-rakan (2002), di mana keadaan ini akan menyebabkan pengurangan dalam penghasilan antibodi oleh sel B yang bergantung kepada pengaktifan limfosit T CD4+. Selain itu keadaan hiperglisemia juga menyebabkan perubahan pada fungsi leukosit, perubahan tindak balas komplimen, perubahan tindak balas mikrovaskular dan perubahan pada penghasilan kemokin serta sitokin (Shilling & Raphael 2008).

Walaupun terdapat ubat-ubatan antihyperglisemia yang mampu mengawal aras glukosa pesakit diabetes, namun penggunaan ubat-ubatan konvensional secara berpanjangan juga mampu memberi kesan sampingan terhadap pesakit diabetes (Kaushik et al. 2008), berbanding dengan penggunaan rawatan yang menggunakan bahan semula jadi. Penggunaan rawatan yang menggunakan tumbuhan semula jadi mampu mengurangkan kesan sampingan ubat-ubatan antihyperglisemia (Modak et al. 2007).

Ekstrak buah rosol atau *H.sabdariffa* (HSE) adalah antara tumbuhan semula jadi yang telah digunakan dalam kajian masa kini bagi menggantikan ubat-ubatan konvensional. Buah rosol mempunyai kandungan sebatian bioaktif utama antaranya antosianin (Tsai et al. 2002), tokoferol gamma (Mohamed et al. 2007), vitamin C dan zat besi yang tinggi (Armenta-Acosta 2006). Chao dan Yin (2008) pula mendapati bahawa buah rosol mempunyai sifat sebagai antioksidan dan antimikrob. Selain itu, *H.sabdariffa* juga telah dibuktikan mampu menjadi agen antidiabetes disebabkan keupayaannya dalam menurunkan aras hiperglisemia dan tekanan oksidatif (Mozaffari-Khosravi et al. 2009).

Walaupun terdapat kajian yang menunjukkan HSE juga dapat meningkatkan sistem imunomodulator pada tikus (Fakeye et al. 2008), namun tiada kajian yang pernah dibuat untuk melihat kesan HSE ke atas organ limpa tikus teraruh diabetes. Oleh itu, kajian ini dilakukan adalah untuk mengenalpasti kesan HSE terhadap tekanan oksidatif dan peratus sel T dalam limpa tikus diabetes aruhan streptozotisin (STZ).

BAHAN DAN KAEDAH

Kajian ini melibatkan 32 ekor tikus jantan spesies Sprague-Dawley dengan berat badan di antara 200-250 g yang telah diperolehi dari Unit Haiwan Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM). Pengendalian tikus kajian ini telah mendapat kelulusan oleh Jawatankuasa Etika Haiwan Universiti Kebangsaan Malaysia (Nombor Kelulusan: FSK/

BIOMED/2011/SATIRAH/30-NOVEMBER/407-NOVEMBER-2011-MAY-2012). Sepanjang tempoh kajian, tikus ditempatkan di Makmal Penyelidikan Haiwan, Program Sains Bioperubatan di UKM kampus Kuala Lumpur dengan pencahayaan dan ventilasi yang sempurna. Tikus diberi makan pellet dan air minuman secara *ad libitum*.

Aruhan diabetes dilakukan dengan menyuntik larutan STZ (Sigma Chemical, St. Louis, Amerika Syarikat) sebanyak 45 mg/kg secara intravena (i.v.) pada vena kaudal, selepas dipuaskan selama semalaman (Kade et al. 2010). Selepas tiga hari disuntik dengan STZ, tikus yang menunjukkan bacaan aras glukosa melebihi 15 mmol/l diambil sebagai tikus kumpulan diabetes. Tikus normal (sebagai kawalan) dan tikus yang mengalami diabetes dibahagikan kepada dua iaitu kumpulan yang menerima rawatan HSE dan kumpulan yang tidak menerima rawatan HSE.

Penyediaan HSE adalah daripada kaedah Chen et al. (2003) yang telah dimodifikasi. Rawatan HSE sebanyak 100 mg/kg berat badan (Wang et al. 2009) diberikan secara paksaan oral pada setiap hari kepada kumpulan-kumpulan kajian yang menerima rawatan HSE. Kesemua tikus menjalani rawatan selama 28 hari bermula pada hari ketiga selepas aruhan STZ. Pada akhir kajian, darah tikus pada bahagian ekor diambil untuk menentukan aras glukosa selepas rawatan dengan menggunakan meter aras glukosa (Accu-Chek Advantage Plus, Roche Diagnostics, Malaysia). Limpa tikus diambil dan dibahagikan kepada dua bahagian. Bahagian pertama adalah untuk penyediaan suspensi sel bagi pengesanan limfosit T, manakala bahagian kedua digunakan dalam ujian tekanan oksidatif seperti aras MDA mengikut kaedah Stocks et al. (1974), aras aktiviti enzim SOD dengan menggunakan kaedah Bayer dan Fridovich (1987) dan aras protein karbonil adalah mengikut kaedah Levine et al. (1990).

Pemerhatian histologi menggunakan pewarnaan hematoksilin dan eosin (H&E) dilakukan berdasarkan kaedah (Reis et al. 2008). Suspensi sel limpa diwarnakan dengan menggunakan antibodi tikus anti-CD3 terkonjugat *fluorescein isothiocyanate* (FITC) Klon 1F4, antibodi anti-CD4 terkonjugat *allophycocyanin* (APC) Klon W3/25 dan antibodi anti-CD8 terkonjugat *phycoerythrin* PE Klon OX-8 (Biolegend, San Diego, Amerika Syarikat), untuk menentukan kehadiran limfosit T CD3+ CD4+ dan CD3+ CD8+ dengan menggunakan sitometri aliran (BD FACSCanto II, BD Bioscience, Amerika Syarikat). Analisis bilangan limfosit T CD3+ CD4+ dan CD3+ CD8+ dilakukan dengan menggunakan perisian FACSDiva.

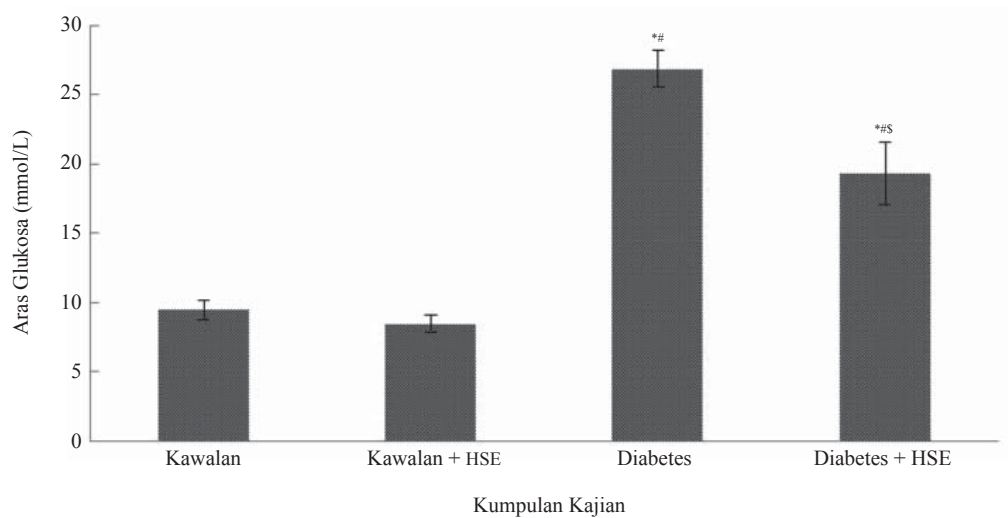
ANALISIS STATISTIK

Hasil kajian dianalisis dengan menggunakan ujian parametrik analisis varian (ANOVA) satu hala. Ujian pos-hoc Tukey digunakan jika terdapat perbezaan yang signifikan pada ujian ANOVA. Semua nilai purata dinyatakan dalam bentuk purata \pm purata ralat piawai (SEM). Nilai perubahan adalah signifikan pada $p < 0.05$.

HASIL KAJIAN

Rajah 1 menunjukkan bahawa STZ menyebabkan keadaan diabetes pada tikus sepanjang kajian dijalankan. Walau bagaimanapun, rawatan HSE menunjukkan penurunan

aras glukosa pada tikus diabetes. Hasil kajian ini juga mendapati terdapat pengurangan berat dan bilangan sel limpa pada kumpulan tikus diabetes (Jadual 1). Namun, rawatan HSE tidak dapat meningkatkan berat limpa dan bilangan sel limpa.



RAJAH 1: Perbandingan aras glukosa darah selepas 28 hari kajian. Nilai yang dinyatakan adalah dalam bentuk purata + SEM.
^{*} $p < 0.05$ jika dibandingkan dengan kumpulan Kawalan. [#] $p < 0.05$ jika dibandingkan dengan kumpulan Kawalan + HSE.
^s $p < 0.05$ jika dibandingkan dengan kumpulan Diabetes

JADUAL 1: Perbandingan jumlah sel dan berat limpa selepas 28 hari kajian

Kumpulan Kajian	Berat Limpa (g) Limpa	Jumlah Sel ($\times 10^7$)
Kawalan	0.48 ± 0.03	2.52 ± 0.1
Kawalan + HSE	0.5 ± 0.04	2.55 ± 0.15
Diabetes	$0.27 \pm 0.05^{*#}$	$1.17 \pm 0.24^{*#}$
Diabetes + HSE	$0.23 \pm 0.03^{*#}$	$0.99 \pm 0.19^{*#}$

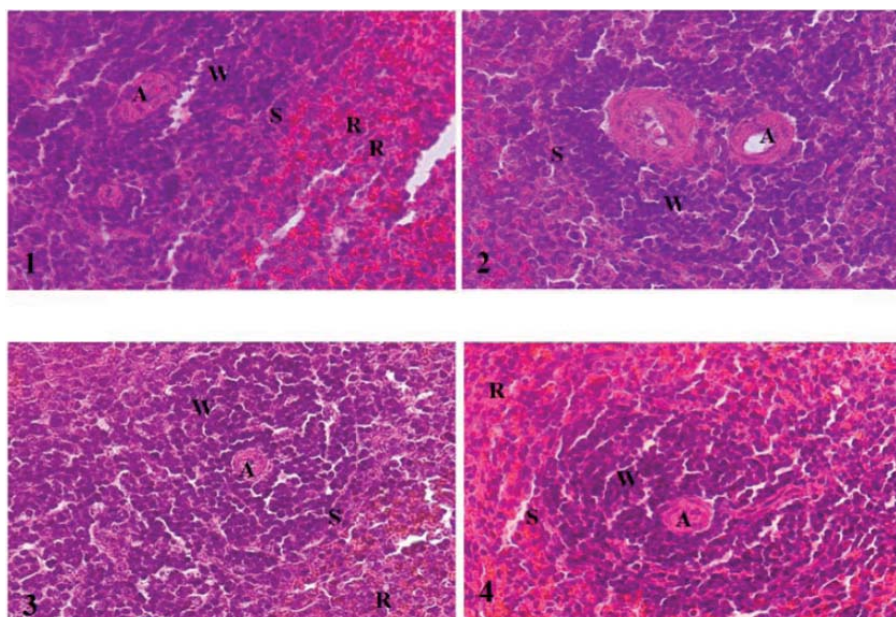
Nilai yang dinyatakan adalah dalam bentuk purata \pm SEM. ^{*} $p < 0.05$ jika dibandingkan dengan kumpulan Kawalan. [#] $p < 0.05$ jika dibandingkan dengan kumpulan Kawalan + HSE

Tekanan oksidatif tidak dapat dikesan pada kumpulan tikus diabetes yang dikaji melalui penentuan aras MDA, aras aktiviti enzim SOD dan aras protein karbonil (Jadual 2). Pemerhatian histologi juga tidak menunjukkan sebarang kerosakan pada struktur limpa tikus diabetes (Rajah 2). Jumlah bilangan limfosit T CD3+ CD4+ (Rajah 3) dan CD3+ CD8+ (Rajah 4) juga tidak menunjukkan sebarang perubahan yang signifikan pada semua kumpulan kajian.

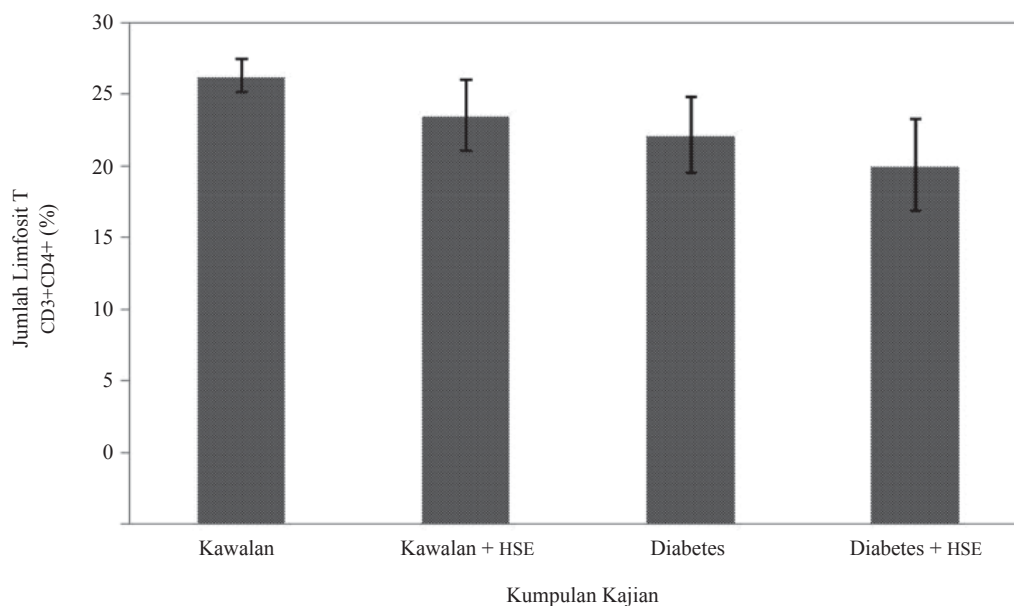
JADUAL 2: Perbandingan aras MDA, aktiviti enzim SOD, aras protein karbonil selepas 28 hari kajian

Kumpulan Kajian	Aras MDA (nmol/mg protein)	Aras Aktiviti SOD (U/mg protein)	Aras Protein Karbonil nmol/ mg protein)
Kawalan	$3.95 \times 10^{-5} \pm 4.3 \times 10^{-6}$	$4.81 \times 10^{-5} \pm 2.2 \times 10^{-6}$	$2.30 \times 10^{-6} \pm 3.0 \times 10^{-7}$
Kawalan + HSE	$3.82 \times 10^{-5} \pm 5.4 \times 10^{-6}$	$5.04 \times 10^{-5} \pm 2.3 \times 10^{-6}$	$2.40 \times 10^{-6} \pm 4.0 \times 10^{-7}$
Diabetes	$4.64 \times 10^{-5} \pm 8.5 \times 10^{-6}$	$4.42 \times 10^{-5} \pm 1.2 \times 10^{-6}$	$2.90 \times 10^{-6} \pm 4.0 \times 10^{-7}$
Diabetes + HSE	$4.44 \times 10^{-5} \pm 5.8 \times 10^{-6}$	$4.51 \times 10^{-5} \pm 1.2 \times 10^{-6}$	$2.40 \times 10^{-6} \pm 2.0 \times 10^{-7}$

Nilai yang dinyatakan adalah dalam bentuk purata \pm SEM



RAJAH 2. Pemerhatian histologi limpa pada pembesaran $\times 40$. Tiada perubahan struktur limpa pada kumpulan Kawalan (1), kumpulan Kawalan yang diberikan rawatan HSE (2), kumpulan Diabetes (3) dan kumpulan Diabetes yang diberikan rawatan HSE (4). **W** mewakili kawasan *white pulp*, **R** mewakili kawasan *red pulp*, **S** mewakili kawasan sempadan *white pulp* dan *red pulp*. **A** mewakili arteriol



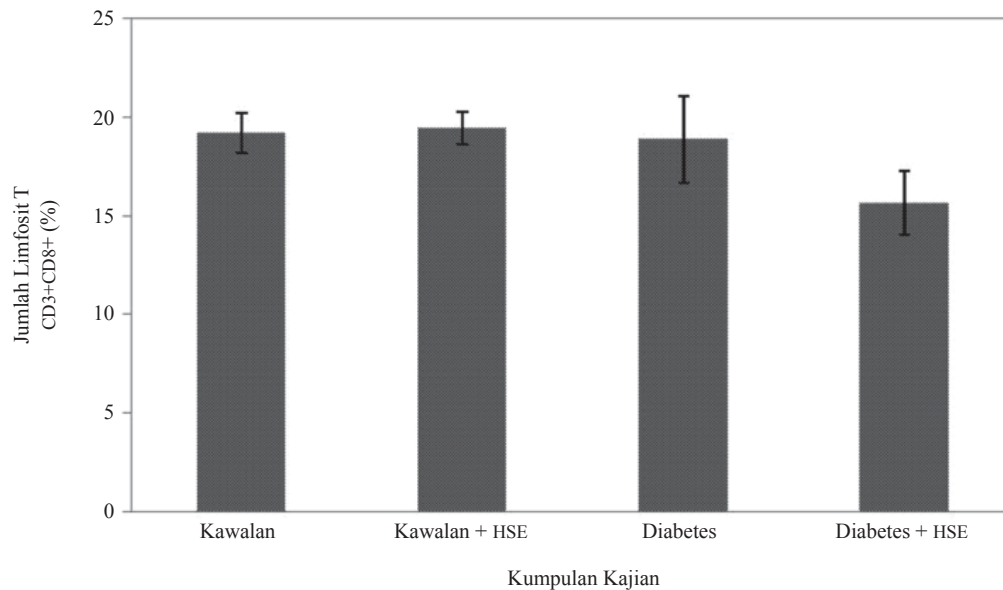
RAJAH 3. Perbandingan jumlah limfosit T CD3+CD4+ selepas 28 hari kajian. Nilai yang dinyatakan adalah dalam bentuk purata + SEM

PERBINCANGAN

Suntikan STZ pada tikus menyebabkan sel β pankreas mengalami apoptosis dan pengurangan penghasilan hormon insulin akan berlaku (Szkudelski 2001). Kesan daripada pengurangan penghasilan hormon insulin akan menyebabkan keadaan hiperglisemia.

Kajian ini mendapati kumpulan kajian yang mengalami keadaan diabetes menunjukkan aras glukosa yang tinggi

sepanjang kajian dijalankan. Namun rawatan HSE selama 28 hari mampu menurunkan aras glukosa pada kumpulan yang mengalami diabetes. Hasil kajian ini menyokong kajian (Agoreyo 2008) yang menunjukkan penurunan aras glukosa darah pada tikus diabetes yang diberikan rawatan HSE. Menurut Tadera et al. (2006) dan Hansawasdi et al. (2000), HSE mampu merencatkan aktiviti enzim α -amilase dan α -glukosidase yang akan menyebabkan pengurangan



RAJAH 4. Perbandingan jumlah limfosit T CD3+ CD8+ selepas 28 hari kajian. Nilai yang dinyatakan adalah dalam bentuk purata \pm SEM

pemecahan karbohidrat dan proses penyerapannya di usus.

Hasil kajian ini juga menunjukkan pengurangan berat limpa dan bilangan sel limpa pada kumpulan kajian yang mengalami diabetes. Kajian yang hampir sama oleh Muller et al. (2011) juga mendapati kesan STZ mampu mengurangkan bilangan sel limpa. Walau bagaimanapun, mekanisme tindakan STZ dalam pengurangan sel limpa masih belum dikenal pasti secara spesifik.

Dalam keadaan diabetes, peningkatan penghasilan ROS akan mengakibatkan penurunan aktiviti enzim antioksidan SOD (Arivazhagam et al. 2000), penurunan aras protein jumlah, peningkatan reaksi lipid peroksidasi dan peningkatan aras penghasilan protein karbonil (Matough et al. 2012). Namun kajian ini mendapati bahawa kumpulan kajian yang mengalami diabetes tidak menunjukkan perubahan yang signifikan terhadap aras MDA, aktiviti enzim antioksidan SOD dan aras protein karbonil pada organ limpa. Hasil kajian ini menunjukkan bahawa limpa tidak mengalami keadaan tekanan oksidatif walaupun berlaku keadaan hiperglisemia.

Bagaimanapun, kajian terdahulu oleh Manna et al. (2010) menunjukkan perubahan yang signifikan pada aras protein jumlah, aras MDA, aktiviti enzim antioksidan SOD dan aras protein karbonil pada limpa tikus teraruh diabetes; apabila kumpulan kajian diaruh dengan STZ sebanyak 70 mg/kg. Sebaliknya kajian ini menggunakan kumpulan kajian diabetes yang diaruh dengan STZ sebanyak 45 mg/kg. Penggunaan dos STZ yang kurang mungkin mempengaruhi tahap keterukan keadaan hiperglisemia untuk meningkatkan penghasilan ROS yang mampu memberi kesan tekanan oksidatif kepada organ limpa.

Keadaan limpa yang tidak mengalami tekanan oksidatif ini juga mungkin menyebabkan tiada perubahan yang signifikan pada bilangan sel limfosit T CD3+ CD4+

dan CD3+ CD8+ pada kumpulan kajian yang mengalami diabetes. Namun, terdapat corak penurunan bilangan limfosit T CD3+ CD4+ dan CD3+ CD8+ pada kumpulan kajian diabetes berbanding dengan kumpulan kajian kawalan. Corak penurunan bilangan limfosit T pada limpa mungkin disebabkan oleh kesan keadaan hiperglisemia. Kajian in vitro oleh Rubinstein et al. (2008) menunjukkan pengurangan proliferasi dan bilangan limfosit limpa pada kepekatan glukosa yang tinggi.

Seterusnya, analisis histologi terhadap struktur limpa tikus diabetes dalam kajian ini telah menyokong dapatan bahawa limpa tidak mengalami tekanan oksidatif. Walaupun kerosakan struktur limpa tikus diabetes boleh dijangkakan seperti yang dilaporkan oleh Badole et al. (2011), namun model kajian yang berbeza berkemungkinan menyebabkan perbezaan analisis yang diperolehi.

KESIMPULAN

Hasil daripada kajian ini menunjukkan bahawa HSE dapat memberi kesan antihyperglycemia yang signifikan ke atas tikus yang mengalami diabetes. Bagaimanapun, model yang digunakan dalam kajian ini tidak dapat menunjukkan perubahan terhadap tekanan oksidatif, patologi limpa dan bilangan limfosit T CD3+CD4+ dan CD3+CD8+ dalam limpa tikus diabetes. Selain itu, kajian ini tidak dapat menunjukkan kesan HSE terhadap limpa tikus diabetes aruhan STZ kerana terdapat limitasi dalam model kajian yang dijalankan.

PENGHARGAAN

Kajian ini telah dijalankan menggunakan geran penyelidikan UKM-GUP-2011-124. Penghargaan ditujukan kepada

RUJUKAN

- Agoreyo, F.O., Agoreyo, B.O. & Onuorah, M.N. 2008. Effect of aqueous extracts of Hibiscus sabdariffa and Zingiber officinale on blood cholesterol and glucose levels of rats. *African Journal of Biotechnology* 7(21): 3949-3951.
- Arivazhagam, P., Thilagavathy, T. & Pannerselvam, C. 2000. Antioxidant lipocate and tissue antioxidants in aged rats. *Journal of Nutritional Biochemistry* 11: 122-127.
- Armenta-Acosta, S. 2006. Identification of the antioxidant properties iron and ascorbic acid contents of Hibiscus sabdariffa calyxes extract. PhD thesis. New Mexico State University, La Cruisers, New Mexico.
- Badole, S.L., Bodhankar, S.L. & Raut, C.G. 2011. Protective effect of cycloart-23-ene-3 β , 25-diol (B2) isolated from Pongamia pinnata L. Pierre on vital organs in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic mice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 1(2, Supplement): S186-S190.
- Bayer, W.F. & Fridovich, I. 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry* 161: 559-566.
- Chao, C.-Y. & Yin, M.-C. 2008. Antibacterial effects of roselle calyx extracts and protocatechuic acid in ground beef and apple juice. *Foodborne Pathogens and Disease* 6(2): 201-206.
- Chen, C.C., Hsu, J.D., Wang, S.F., Chiang, H.C., Yang, M.Y., Kao, E.S., Ho, Y.C. & Wang, C.J. 2003. Hibiscus sabdariffa extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Journal of Agriculture and Chemistry* 51(18): 5472-5477.
- Eibl, N., Spatz, M., Fischer, G.F., Mayr, W.R., Samstag, H.M., Wolf, G. & Scherthaner, M.M. 2002. Impaired primary immune response in type 1 diabetes: result from a controlled vaccination study. *Clinical Immunology* 103(3): 249-259.
- Fakeye, T.O., Pal, A., Bawankule, D.U. & Khanuja, S.P.S. 2008. Immunomodulatory effect of extracts of Hibiscus sabdariffa L. (Family Malvaceae) in a mouse model. *Phytotherapy Research* 22(5): 664-668.
- Geerlings, S.E. & Hoepelman, A.I.M. 1999. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *Immunology and Medical Microbiology* 26(3-4): 259-265.
- Hansawasdi, C., Kawabata, J. & Kasai, T. 2000. α -Amylase Inhibitors from Roselle (Hibiscus sabdariffa Linn.) Tea. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 64(5): 1041-1043.
- Kade, I.J., Barbosa, N.B.V., Ibukun, E.O., Igbakin, A.P., Nogueira, C.W. & Rocha, J.B.T. 2010. Aqueous extracts of Sphagneticola trilobata attenuates streptozotocin-induced hyperglycaemia in rat models by modulating oxidative stress parameters. *Biology and Medicine* 2(3): 1-13.
- Kaushik, G., Satya, S., Khandelwal, R.K. & Naik, S.N. 2008. A commonly consumed Indian plant food materials in the management of diabetes mellitus. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews* 4(1): 21-40.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I. & Lenz, A., et al. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymology* 186: 464-478.
- Manna, P., Ghosh, J., Das, J. & Sil, P.C. 2010. Streptozotocin induced activation of oxidative stress responsive splenic cell signaling pathways: Protective role of arjunolic acid. *Toxicology and Applied Pharmacology* 244(2): 114-129.
- Matough, F.A., Budin S.B., Hamid, Z.A., Alwahaibi, N. & Mohamed, J. 2012. The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic complications. *Sultan Qaboos University Medical Journal* 12(1): 5-8.
- Modak, M., Dixit, P., Londhe, J., Ghaskadbi, S. & Devasagayam, T.P.A. 2007. Indian herbs and herbal drugs used for the treatment of diabetes. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 40(3): 163-173.
- Mohamed, R., Fernandez, J., Pineda, M. & Aguilar, M. 2007. Roselle (Hibiscus sabdariffa) seed oil is a rich source of gamma-tocopherol. *Journal of Food Science* 72(3): 207-211.
- Mozaffari-Khosravi, H., Jalali-Khanabadi, B.-A., Afkhami-Ardekani, M., Fatehi, F. & Noori-Shadkam, M. 2009. The effects of sour tea (Hibiscus sabdariffa) on hypertension in patients with type II diabetes. *Journal of Human Hypertension* 23: 48-54.
- Muller, L.M.A.J., Gorter, K.J., Hak, E., Goudzwaard, W.L., Schellevis, F.G., Hoepelman, A.I.M. & Rutten, G.E.H.M. 2005. Increased risk of common infections in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Clinical Infectious Diseases* 41(3): 281-288.
- Muller, Y.D., Golshayan, D., Ehrchiou, D., Wyss, J.C., Giovannoni, L., Maier, R., Serre-Beiner, V., Yung, G.P., Morel, P., Buhler, L.H. & Seebach, J.D. 2011. Immunosuppressive effects of streptozotocin-induced diabetes result in absolute lymphopenia and relative increase of T regulatory cells. *Diabetes* 60(9): 2331-2340.
- Rahimi, R., Nikfar, S., Larijani, B. & Abdollahi, M. 2005. A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 59(7): 365-373.
- Reis, C.P., Figueiredo, I.V., Carvalho, R.A., Jones, J., Nunes, P., Soares, A.F., Silva, C.F., Ribeiro, A.J., Veiga, F.J., Damg e, C., Cabrita, A.M.S. & Neufeld, R.J. 2008. Toxicological assessment of orally delivered nanoparticulate insulin. *Nanotoxicology* 2(4): 205-217.
- Robertson, R.P. & Harmon, J.S. 2006. Diabetes, glucose toxicity, and oxidative stress: A case of double jeopardy for the pancreatic islet beta cell. *Free Radical Biology & Medicine* 41(2): 177-184.
- Rolo, A.P. & Palmeira, C.M. 2006. Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology* 212(2): 167-178.
- Rubinstein, R., Genaro, A.M., Motta, A., Cremaschi, G. & Wald, M.R. 2008. Impaired immune responses in streptozotocin-induced type I diabetes in mice. Involvement of high glucose. *Clinical and Experimental Immunology* 154(2): 235-246.
- Shilling, A.M. & Raphael, J. 2008. Diabetes, Hyperglycemia, and Infections. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology* 22(3): 519-535.
- Stocks, J., Gutteridge, J.M.C., Sharp R.J. & Dormandy, T.L. 1974. Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids. *Journal Neurochemistry* 47: 215.
- Szkudelski, T. 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological Research* 50: 536-546.

- Tadera, K., Minami, Y., Takamatsu, K. & Matsuoka, T. 2006. Inhibition of alpha-Glucosidase and alpha-Amylase by Flavonoids. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 52(2): 149-153.
- Tsai, P.J., McIntosh, J., Pearce, P., Camden, B. & Jordan, B.R. 2002. Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (Hibiscus Sabdariffa L.) extract. *Food Research International* 35(4): 351-356.
- Wang, S.C., Lee, S.F., Wang, C.J., Lee, C.H., Lee, W.C. & Lee, H.J. 2009. Aqueous extract from Hibiscus sabdariffa Linnaeus ameliorate diabetic nephropathy via regulating oxidative status and akt/bad/14-3-3 γ in an experimental animal model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2011: 1-9.

Nor Malia Abd Warif
Asyraf Akmal Ayob
Wan Marahaini Wan Razali
Muhd Hanis Md Idris
Siti Balkis Budin
Satirah Zainalabidin
Jamaludin Mohamed
Program Sains Bioperubatan
Pusat Pengajian Sains Diagnostik dan Kesihatan Gunaan
Fakulti Sains Kesihatan
Jalan Raja Muda Abdul Aziz
50300 Kuala Lumpur.

Pengarang untuk dihubungi: Nor Malia Abd Warif
Alamat emel: nawarif@fsk.ukm.my
Tel: 603 92897681; Fax: 603 26929032

Diterima: Julai 2013
Diterima untuk penerbitan: Disember 2013

