

**PENGARUH EKSTRAK DAUN SALAM (*Syzygium polyanthum*)
TERHADAP KADAR INTERLEUKIN-1 (IL-1)
(Studi Eksperimental pada Tikus Putih Jantan Galur Wistar yang Diinduksi
Karagenan)**

Skripsi

untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai gelar Sarjana Kedokteran



Oleh :

Nisrina Adiba Aysar

30102000136

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG**

2024

SKRIPSI

PENGARUH EKSTRAK DAUN SALAM (*Syzygium polyanthum*) TERHADAP KADAR INTERLEUKIN-1 (IL-1) (Studi Eksperimental pada Tikus Putih Jantan Galur Wistar yang Diinduksi Karagenan)

Yang dipersiapkan dan disusun oleh :


Nisrina Adiba Aysar
30102000136

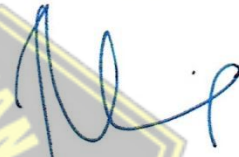
telah dipertahankan di depan Dewan Penguji
pada tanggal 29 Januari 2024
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Susunan Tim Penguji

Pembimbing I

Penguji I



dr. Sampurna, M.Kes


dr. Nurina Tyagita, M.Biomed

Pembimbing II

Penguji II


dr. Bagas Widiyanto, M.Biomed


dr. Meidona Nurul Milla, MCE

Semarang, 15 Februari 2024

Fakultas Kedokteran
Universitas Islam Sultan Agung
Dekan.



Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S.H., SpKF

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Nisrina Adiba Aysar

NIM : 30102000136

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi yang berjudul :

**“PENGARUH EKSTRAK DAUN SALAM (*Syzygium polyanthum*)
TERHADAP KADAR INTERLEUKIN-1 (Studi Eksperimental pada Tikus
Jantan Galur Wistar yang Diinduksi Karagenan)”**

Adalah benar hasil karya saya dan penuh kesadaran bahwa saya tidak melakukan tindakan plagiasi atau mengambil alih seluruh atau sebagian besar skripsi orang lain tanpa menyebutkan sumbernya. Jika saya terbukti melakukan tindakan plagiasi, saya bersedia menerima sanksi sesuai dengan aturan yang berlaku.

Semarang, 26 Januari 2024



Nisrina Adiba Aysar

PRAKATA

Assalamualaikum warahmatullahi wabarakatuh

Alhamdulillahirobbil'alamin, puji syukur kehadiran Allah SWT atas anugerah dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini yang berjudul **“PENGARUH EKSTRAK DAUN SALAM (*Syzygium polyanthum*) TERHADAP KADAR INTERLEUKIN-1 (Studi Eksperimental pada Tikus Jantan Galur Wistar yang Diinduksi Karagenan)”**.

Terselesaikannya penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari doa, dukungan, dan bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan ucapan terimakasih kepada :

1. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, Sp. KF., S.H. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
2. dr. Sampurna, M.Kes selaku Dosen Pembimbing I dan dr. Bagas Widiyanto, M.Biomed selaku Pembimbing II yang telah memberikan bimbingan, saran dan dorongan sehingga penyusunan skripsi ini dapat terselesaikan.
3. dr. Nurina Tyagita, M.Biomed selaku Dosen Penguji I dan dr. Meidona Nurul Milla, MCE selaku Dosen Penguji II yang telah meluangkan waktu, pikiran, serta ilmu dalam penyempurnaan skripsi ini.
4. Kepala Bagian Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada serta staff dan jajarannya yang telah membantu dan menyediakan tempat untuk

penelitian ini dari awal hingga selesai.

5. Kedua orang tua saya yang saya sayangi dan cintai, serta keluarga besar yang telah memberikan doa, semangat, serta dukungan moral, dan spiritual selama penyusunan skripsi ini.
6. Teman - teman saya Tania Octavia, Dina Nikmatul Ulya, Rani Windasari Pratami, Dede Guscella, David Adi Wibowo, dan ASTROCYTES angkatan 2020 FK UNISSULA yang telah memberikan dukungan serta semangat dalam pengerjaan skripsi ini.
7. Rekan sejawat penelitian saya Cantika Rizki Dewinda Putri dan Muhamad Brave Sinatrya yang sudah kebersamai saya selama penyusunan skripsi.
8. Asisten - asisten Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
9. Serta pihak yang tidak dapat saya sebutkan yang telah membantu dalam penyelesaian skripsi ini baik secara langsung ataupun tidak langsung.

Penulis menyadari bahwa penyusunan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, penulis mengharapkan saran dan kritik yang membangun demi perbaikan di waktu mendatang.

Wassalamualaikum warahmatullahi wabarakatuh

Semarang, 26 Januari 2024

Penulis,

Nisrina Adiba Aysar

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	ii
SURAT PERNYATAAN	iii
PRAKATA.....	iv
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR SINGKATAN	x
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
INTISARI.....	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Perumusan Masalah.....	4
1.3. Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1 Tujuan Umum	4
1.3.2 Tujuan Khusus.....	4
1.4. Manfaat Penelitian.....	5
1.4.1. Manfaat Teori.....	5
1.4.2. Manfaat Praktis	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1. Interleukin-1 (IL-1)	6
2.1.1. Definisi IL-1.....	6
2.1.2. Karakteristik IL-1	6
2.1.3. Mekanisme Sekresi IL-1	7
2.2. Inflamasi.....	7
2.2.1. Definisi Inflamasi.....	7
2.2.2. Tanda Kardinal Inflamasi.....	8
2.2.3. Faktor yang Memengaruhi Tingkat Inflamasi.....	10
2.2.4. Proses Terjadinya Inflamasi	12
2.3. Daun Salam	17
2.3.1. Secara Umum	17
2.3.2. Morfologi	17
2.3.3. Kandungan Daun Salam.....	18

2.4. Karagenan.....	22
2.5. Hubungan Ekstrak Daun Salam terhadap Kadar IL-1 pada Tikus Putih Jantan Galur Wistar yang diinduksi Karagenan.....	23
2.6. Kerangka Teori.....	25
2.7. Kerangka Konsep	25
2.8. Hipotesis.....	25
BAB III METODE PENELITIAN.....	26
3.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	26
3.2. Variabel dan Definisi Operasional	26
3.2.1. Variabel Penelitian	26
3.2.2. Definisi Operasional.....	26
3.3. Populasi dan Sampel	27
3.3.1. Populasi	27
3.3.2. Sampel.....	28
3.3.3. Kriteria Inklusi	28
3.3.4. Kriteria Eksklusi	29
3.4. Instrumen dan Bahan Penelitian.....	29
3.4.1. Instrumen Penelitian.....	29
3.4.2. Bahan Penelitian.....	30
3.5. Cara Penelitian	30
3.5.1. Pengajuan Ethical Clearance.....	30
3.5.2. Pembuatan Ekstrak Daun Salam	30
3.5.3. Pembuatan Suspensi Karagenan	31
3.5.4. Dosis Penelitian.....	32
3.5.5. Pemberian Perlakuan.....	33
3.5.6. Prosedur Pengambilan Darah Tikus.....	33
3.5.7. Pemeriksaan Kadar Interleukin – 1	34
3.6. Tempat dan Waktu Penelitian	35
3.6.1. Tempat	35
3.6.2. Waktu	35
3.7. Alur Penelitian.....	36
3.8. Analisis Data	37
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....	38
4.1. Hasil Penelitian	38
4.2. Pembahasan.....	41
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	43
5.1. Kesimpulan.....	43

5.2. Saran.....	43
DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN.....	48



DAFTAR SINGKATAN

COX-1	: <i>Siklooksigenase 1</i>
COX-2	: <i>Siklooksigenase 2</i>
CRP	: <i>C-reactive protein</i>
CXCL1	: <i>C-X-C motif chemokine ligand 1</i>
CXCL8	: <i>C-X-C motif chemokine ligand 8</i>
CXCR1	: <i>Chemokine (C-X-C motif) receptor 1</i>
CXCR2	: <i>Chemokine (C-X-C motif) receptor 2</i>
DAMP	: <i>Damage Associated Molecular Pattern</i>
DC	: <i>Dendritic Cell</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic acid</i>
E-selectin	: <i>Endothelial-selectin</i>
ECM	: <i>Extracellular Matrix</i>
IL-1	: <i>Interleukin-1</i>
IL-6	: <i>Interleukin-6</i>
iNOS	: <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
LPS	: <i>Lipopolisakarida</i>
NF- κ B	: <i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NLRP3	: <i>NLR Family Pyrin Domain Containing 3</i>
NO	: <i>Nitric Oxide</i>
NOS	: <i>Nitric Oxide Synthase</i>
PAMP	: <i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
PGD2	: <i>Prostaglandin D2</i>
PGE2	: <i>Prostaglandin E2</i>
PGF2 α	: <i>Prostaglandin F2 Alpha</i>
PGI2	: <i>Prostaglandin I2</i>
PGE	: <i>Prostaglandin</i>
PRR	: <i>Pattern Recognition Receptors</i>
PSGL-1	: <i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
RISKESDAS	: <i>Riset Kesehatan Dasar</i>
TCR	: <i>T-cell Receptor</i>

TLR : *Toll Like Receptor*
TNF- α : *Tumor Necrosis Factor Alpha*
TNFR : *Tumor Necrosis Factor Receptor*
TXA2 : *Thromboxane A2*
WHO : *World Health Organization*



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Skrining Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Salam	19
Tabel 4.1 Hasil Analisa Uji Normalitas, Homogenitas, dan One Way ANOVA .	40
Tabel 4.2 Hasil Analisis Uji Post Hoc LSD.....	40



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Aktivasi NF-Kb.....	14
Gambar 2.2. Jalur Asam Arakidonat.....	15
Gambar 2.3. Morfologi Daun Salam (<i>Syzygium polyanthum</i>).....	18
Gambar 2.4. Mekanisme Penghambatan Inflamasi Oleh Flavonoid.....	20
Gambar 2.5. Mekanisme Penghambatan Inflamasi Oleh Tanin	21
Gambar 2.6. Kerangka Teori.....	25
Gambar 2.7. Kerangka Konsep	25
Gambar 3.1. Alur Penelitian.....	36
Gambar 4.1. Hasil Rerata Kadar IL-1 Pada Setiap Kelompok Penelitian	39



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Perhitungan Kadar IL-1.....	48
Lampiran 2. Hasil Perhitungan Rata – Rata Kadar IL-1 dan Standar Deviasi dengan Uji Deskriptif.....	49
Lampiran 3. Hasil Analisis Uji Normalitas dan Homogenitas Data Kadar IL-1 dengan <i>Shapiro-Wilk</i> dan <i>Levene Test</i>	50
Lampiran 4. Hasil Uji Analisis Statistik Parametrik One Way Anova dan Post Hoc LSD.....	50
Lampiran 5. Proses Penelitian.....	52
Lampiran 6. Ethical Clearance.....	54
Lampiran 7. Surat Keterangan Bebas Penelitian.....	55



INTISARI

Inflamasi merupakan respon pertahanan tubuh non spesifik terhadap kerusakan jaringan akibat aktivasi *Toll-Like Receptor-4* (TLR4) serta jalur asam arakidonat yang ditandai dengan peningkatan kadar Interleukin-1 (IL-1). Ekstrak daun salam berperan sebagai antiinflamasi sehingga dapat mencegah peningkatan ekspresi *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B) pada jalur tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun salam terhadap kadar IL-1 pada tikus jantan galur wistar yang diinduksi karagenan.

Penelitian dilakukan menggunakan 24 tikus putih jantan galur wistar sebagai hewan uji coba dibagi menjadi 4 kelompok secara acak. Kelompok kontrol normal (KN) diberi pakan standar dan aquades; kelompok kontrol sakit (KS) diberi pakan standar, aquades dan induksi Karagenan 1%; kelompok perlakuan 1 (KP1) diberi pakan standar, aquades, ekstrak daun salam 100 mg/kgBB dan induksi Karagenan 1%; kelompok perlakuan 2 (KP2) diberi pakan standar, aquades, ekstrak daun salam 200 mg/kgBB dan induksi Karagenan 1%. Pengukuran kadar IL-1 dilakukan di akhir perlakuan menggunakan ELISA.

Rerata kadar IL-1 Kelompok Normal 0,27 pg/ml (SD \pm 0,029) , Kelompok Sakit 1,60 pg/ml (SD \pm 0,065) , Kelompok Perlakuan 1 0,77 pg/ml (SD \pm 0,046) dan Kelompok Perlakuan 2 0,52 pg/ml (SD \pm 0,040). Hasil uji normalitas ($p > 0,05$), homogenitas ($p > 0,05$), *One Way Anova* ($p = 0,000$) berbeda signifikan, dilanjutkan dengan uji *Post Hoc LSD*, menunjukkan ada perbedaan signifikan antara semua kelompok ($p < 0,05$).

Kesimpulan penelitian ini adalah bahwa ekstrak daun salam berpengaruh terhadap kadar Interleukin-1 pada tikus yang diinduksi Karagenan.

Kata kunci : Karagenan 1%, Daun Salam, Interleukin-1

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Inflamasi merupakan respon pertahanan tubuh non spesifik terhadap kerusakan jaringan. Kondisi yang dapat memicu inflamasi adalah patogen, abrasi, iritasi kimia, gangguan sel, dan suhu ekstrim (Tortora dan College, 2016). Salah satu contoh patogen adalah kelompok polisakarida yaitu *Lambda-carrageenan* yang pada prosesnya akan berikatan dengan reseptor *Toll Like Receptor-4* (TLR4) sehingga akan terjadi aktivasi jalur *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF-κB) (Myers *et al.*, 2019). Aktivasi dari jalur NF-κB akan menghasilkan sitokin dan menginduksi terjadinya polarisasi sel inflamasi, contohnya makrofag yang kemudian dapat menginduksi enzim siklooksigenase-2 (COX-2) untuk sintesis prostaglandin pada jalur asam arakidonat, sehingga akan terjadi respon inflamasi melalui pelepasan sitokin. Salah satu contoh sitokin yang dihasilkan dan berperan utama dalam inflamasi adalah Interleukin-1 (IL-1) (Abbas *et al.*, 2018). Inflamasi dapat dihambat melalui berbagai pengobatan, salah satunya melalui pemanfaatan tanaman obat. Daun salam telah diteliti memiliki efek anti inflamasi, namun penelitian menggunakan ekstrak daun salam sebagai anti inflamasi dalam hal ini IL-1 belum banyak dilakukan.

Peningkatan kadar IL-1 terlihat pada gambaran proses inflamasi baik fase akut maupun kronis (Abbas *et al.*, 2018). Data *World Health*

Organization (WHO) menyatakan bahwa 3 dari 5 orang di seluruh dunia meninggal karena penyakit inflamasi kronis seperti stroke, kanker, obesitas, rheumatoid arthritis dan diabetes (WHO, 2020). Penelitian yang telah dilakukan pada tahun 2009 hingga 2019 menunjukkan bahwa stroke berada pada peringkat teratas penyakit inflamasi kronik penyebab kematian pada negara berpenghasilan menengah ke atas, seperti Indonesia (Vos *et al.*, 2020). Laporan hasil Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) (2018) jumlah penderita stroke yang merupakan penyakit inflamasi penyebab kematian tertinggi di Indonesia telah mencapai sebanyak 10,9% dan di Jawa Tengah mencapai 11,8%. Penyakit inflamasi lain yaitu *rheumatoid arthritis* telah mencapai sebanyak 7,30% di Indonesia dan sejumlah 6,78% di Jawa Tengah (Fauzi *et al.*, 2019). Upaya meminimalisir proses inflamasi akut penting dilakukan supaya tidak berkembang menjadi inflamasi kronis, antara lain menggunakan daun salam.

Ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*) mengandung komponen bioaktif utama yaitu flavonoid, tannin, saponin, eugenol, *citric acid*, karbohidrat, steroid, alkaloid, triterpenoid dan *essential oils* (Batool *et al.*, 2019). Kandungan daun salam terutama flavonoid, tanin dan saponin sebagai antiinflamasi dapat menghambat enzim siklooksigenase pada metabolisme asam arakidonat dan transkripsi gen yang bergantung pada jalur NF-kB, sehingga terjadi penghambatan pembentukan sitokin pro inflamasi (Amirah *et al.*, 2020). Penelitian oleh Agustina (2015) ditemukan bahwa pemberian ekstrak daun salam dosis 150 mg/KgBB

menunjukkan penurunan volume inflamasi telapak kaki tikus yang diinduksi karagenan 1% (Agustina *et al.*, 2015). Hasil penelitian oleh Cahyaning (2018) menjelaskan bahwa efek toksisitas tercapai pada daun salam dosis 250 mg/KgBB (Cahyaningsih *et al.*, 2018). Penelitian lain oleh Salsabila (2022), terkait ekstrak tamarillo yang memiliki kandungan mirip dengan daun salam terbukti memiliki aktivitas sebagai anti inflamasi terhadap tikus putih jantan galur wistar yang diinduksi karagenan 1%, dibuktikan bahwa dosis 140 mg/KgBB 24 jam pasca induksi karagenan efektif menurunkan kadar Interleukin-6 (IL-6) (Salsabila dan Sudiono, 2022).

Berdasarkan uraian di atas, peningkatan pembentukan sitokin pro-inflamasi terutama IL-1 diharapkan dapat berkurang dengan pemberian ekstrak daun salam dikarenakan terbukti bahwa daun salam berperan menghambat aktivitas NF- κ B dan COX-2 (Amirah *et al.*, 2020). Hal ini yang menyebabkan peneliti melakukan penelitian terkait pengaruh pemberian ekstrak daun salam terhadap kadar Interleukin-1 pada tikus jantan galur wistar yang diinduksi karagenan.

1.2. Perumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh ekstrak daun salam terhadap kadar Interleukin-1 (IL-1) pada tikus putih jantan galur wistar yang diinduksi karagenan?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh ekstrak daun salam terhadap kadar Interleukin-1 (IL-1) pada tikus putih jantan galur wistar yang diinduksi karagenan.

1.3.2 Tujuan Khusus

- 1.3.2.1. Mengetahui rerata kadar Interleukin-1 pada tikus putih jantan galur wistar yang diberi diet pakan standar
- 1.3.2.2. Mengetahui rerata kadar Interleukin-1 pada tikus putih jantan galur wistar yang diinduksi karagenan
- 1.3.2.3. Mengetahui rerata kadar Interleukin-1 pada tikus putih jantan galur wistar yang diberi ekstrak daun salam 100 mg/kgBB + induksi karagenan
- 1.3.2.4. Mengetahui rerata kadar Interleukin-1 pada tikus putih jantan galur wistar yang diberi ekstrak daun salam 200 mg/kgBB + induksi karagenan
- 1.3.2.5. Menganalisis perbedaan antar kelompok penelitian

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teori

Data analisa hasil pada penelitian ini diharapkan dapat dijadikan penelitian pendahuluan mengenai pengaruh ekstrak daun salam terhadap kadar Interleukin-1 (IL-1).

1.4.2. Manfaat Praktis

Penelitian ini diharapkan dapat dijadikan bahan informasi masyarakat terkait pengaruh ekstrak daun salam sebagai anti inflamasi pada kondisi akut.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Interleukin-1 (IL-1)

2.1.1. Definisi IL-1

IL-1 adalah sitokin pro inflamasi yang berperan sebagai mediator utama inflamasi melalui pengendalian berbagai proses (Kaneko *et al.*, 2019). Sitokin merupakan produk polipeptida regulator inflamasi yang mengatur jalur seluler untuk melindungi organ, namun apabila dalam keadaan yang berlebihan dapat menunjukkan gangguan inflamasi yang parah (Jang *et al.*, 2013).

2.1.2. Karakteristik IL-1

IL-1 disintesis oleh berbagai sel namun yang utama adalah monosit, makrofag teraktivasi, sel dendritik, sel T dan B, dan sel NK (*natural killer*). IL-1 adalah sitokin yang juga diproduksi ketika inflammasome teraktivasi. IL-1 menstimulasi fibroblas, yang menghasilkan peningkatan proliferasi dan produksi *extracellular matrix* (ECM) dan kemudian masuk ke sirkulasi lalu menginduksi reaksi fase akut sistemik yang terkait dengan kondisi infeksi dan inflamasi (Kumar *et al.*, 2013). IL-1 menginduksi inflamasi akut dan menyebabkan demam karena dapat menstimulasi produksi prostaglandin di hipotalamus (Abbas *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2013)

2.1.3. Mekanisme Sekresi IL-1

Sel pada suatu jaringan yang mengalami kerusakan akan melepaskan IL-1 dan menyebabkan terjadinya migrasi neutrofil dan monosit yang dapat mengaktivasi sel endotel untuk mengekspresikan molekul *Endothelial-selectin* (E-selectin). Sel neutrofil aktif merespon dengan cara mengekspresikan reseptor *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1) yang dapat mengikat *P-selectin* dan *E-selectin* *endotelial* sehingga terjadi perlekatan dan migrasi. Proses migrasi dimulai dengan pelepasan kemokin CXCL 8 oleh sel makrofag sebagai sinyal bagi sel neutrofil. Neutrofil merespon dengan mengikat CXCL 8 melalui reseptor CXCR 1 dan CXCR 2. Sel makrofag juga melepas kemokin CXCL1 untuk memperkuat daya kemotaksis. Faktor kemotaksis lainnya adalah aktivasi jalur komplemen sebagai sinyal kemotaksis dan aktivasi sel neutrofil dan monosit. Akhir dari proses aktivasi tersebut menyebabkan reaksi inflamasi dan fagositosis pada sel yang mati (Kumar *et al.*, 2013).

2.2. Inflamasi

2.2.1. Definisi Inflamasi

Inflamasi merupakan respon pertahanan tubuh non spesifik terhadap kerusakan jaringan. Inflamasi bertujuan untuk menghilangkan mikroba, toksin atau benda asing dan mencegahnya agar tidak menimbulkan penyebaran pada jaringan lain sehingga tercapai homeostasis jaringan (Tortora dan College, 2016).

Terdapat dua tahap utama inflamasi :

- 1) Tahap vasodilatasi (pembesaran diameter) pembuluh darah kecil dan peningkatan permeabilitas vaskuler kapiler. Substansi yang berperan pada tahap ini adalah histamin, kinins, prostaglandin (PGs), leukotrienes, dan sistem komplemen.
- 2) Tahap seluler melibatkan migrasi leukosit dari sirkulasi yang teraktivasi untuk menghilangkan agen yang berbahaya. Pada tahap seluler akut, terjadi perubahan pada sel endotel yang melapisi arteri darah, serta migrasi leukosit fagosit ke lokasi cedera atau infeksi (Tortora dan College, 2016).

2.2.2. Tanda Kardinal Inflamasi

Indikator utama pada proses inflamasi yaitu *rubor* (kemerahan), *tumor* (edema/pembengkakan), *kalor* (panas lokalis) *dolor* (rasa nyeri), dan *functio laesa* (gangguan/kehilangan fungsi) (Abbas *et al.*, 2018; Tortora dan College, 2016).

1) Kemerahan (*rubor*)

Munculnya warna kemerahan disebabkan oleh pelebaran pembuluh darah arteri yang mensuplai darah ke area inflamasi sehingga meningkatkan aliran darah ke area yang cedera.

2) Rasa panas (*kalor*)

Rasa panas dan kemerahan terjadi pada waktu yang sama. Rasa panas terjadi akibat jumlah darah pada area yang meradang lebih banyak dibandingkan pada bagian lain di sekitar peradangan. Fenomena termal ini terjadi ketika inflamasi terjadi di permukaan kulit.

3) Rasa nyeri (*dolor*)

Rasa nyeri dari inflamasi diakibatkan oleh:

- a) Edema menyebabkan pelebaran jaringan kemudian terjadi peningkatan tekanan dan timbul rasa nyeri,
- b) Inflamasi memicu produksi bradykinin, prostaglandin dan histamin yang merupakan mediator pemicu neuron perifer menimbulkan rasa nyeri

4) Pembengkakan (*tumor*)

Gejala peradangan yang paling jelas adalah pembengkakan akibat peningkatan permeabilitas kapiler. Hal ini akan menyebabkan protein plasma keluar dari pembuluh darah dan memasuki ruang interstitial.

5) *Functio laesa*

Functio laesa adalah disfungsi jaringan yang rusak dan sekitarnya akibat proses inflamasi.

2.2.3. Faktor yang Memengaruhi Tingkat Inflamasi

1) Usia

Immunosenescence, yang merupakan disregulasi sistem imun bawaan yang berkaitan dengan usia, ditandai dengan respons inflamasi yang persisten. *Immunosenescence* meningkatkan kerentanan terhadap keganasan, autoimunitas, dan infeksi; mengurangi respons terhadap vaksinasi; dan mengganggu penyembuhan luka. Disregulasi ini terjadi akibat peningkatan sirkulasi sitokin pro-inflamasi dan protein fase akut pada orang tua bahkan tanpa adanya infeksi, menunjukkan peradangan kronis tingkat rendah dari penuaan yang dikenal sebagai *inflammaging* (Sanada *et al.*, 2018).

2) Jenis Kelamin

Reaksi inflamasi dipengaruhi oleh status hormonal. Kadar sitokin yang lebih tinggi pada laki-laki dapat dijelaskan dengan perbedaan dalam hubungan kompleks antar mediator inflamasi. Laki - laki memiliki koefisien variasi (kemiringan) yang jauh lebih rendah daripada perempuan, produksi IL-1 atau TNF α lebih tinggi pada laki-laki (Casimir *et al.*, 2010).

3) Pola Hidup dan Nutrisi

C-reactive protein (CRP), sebuah protein fase akut, merupakan bagian dari jalur inflamasi IL-1 β , IL-6, dan konsentrasi CRP plasma ≤ 10 mg/L mencerminkan inflamasi tingkat rendah sistemik. Penghentian aktivitas merokok, peningkatan aktivitas fisik, dan penurunan berat badan berhubungan dengan penurunan konsentrasi CRP pada pasien dengan penyakit kardiovaskular. Pasien dengan ringkasan skor peningkatan gaya hidup tertinggi memiliki penurunan konsentrasi CRP terbanyak. Hasil ini menunjukkan bahwa perubahan gaya hidup sehat berkontribusi untuk menurunkan inflamasi sistemik, berpotensi menurunkan risiko kardiovaskular (Kantor *et al.*, 2013; Wiebe *et al.*, 2022).

2.2.4. Proses Terjadinya Inflamasi

2.2.4.1. Pemicu Inflamasi

Kondisi yang dapat memicu inflamasi adalah patogen, abrasi, iritasi kimia, distorsi atau gangguan sel, dan suhu ekstrim. Inflamasi dikategorikan ke dalam dua jenis; inflamasi akut dan kronis. Inflamasi akut merupakan proses yang cepat dan memengaruhi pembuluh darah lokal, sistem kekebalan tubuh dan beberapa sel, sedangkan pada proses inflamasi kronis sebagian besar dipengaruhi oleh sel darah putih (Tortora dan College, 2016). Inflamasi meningkatkan ekspresi mediator inflamasi, seperti *nitric oxide* (NO) dan prostaglandin E2 (PGE2), yang masing - masing diatur oleh NO sintase (NOS) dan siklooksigenase (COXs), serta sitokin proinflamasi seperti IL-1 β , IL-6 dan *tumor necrosis factor- α* (TNF- α). Regulator inflamasi ini diperlukan untuk mengatur jalur seluler yang terlibat dalam melindungi organ. Respon inflamasi yang berlebihan dapat menyebabkan ekspresi berlebih pada faktor proinflamasi, sehingga dapat mengakibatkan gangguan inflamasi yang tidak terkontrol (Jang *et al.*, 2013).

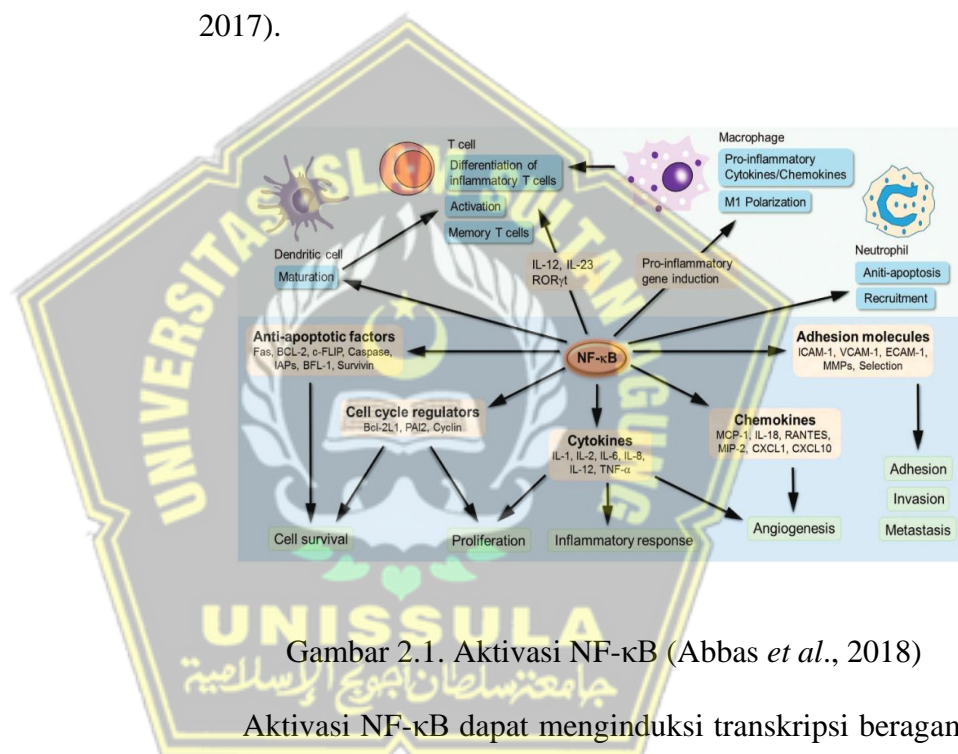
2.2.4.2. Pengaktifan NF- κ B

NF- κ B adalah faktor transkripsi yang mengontrol imun bawaan dan adaptif. NF- κ B memicu aktivasi berbagai gen

pro-inflamasi, seperti gen yang bertanggung jawab menghasilkan sitokin dan kemokin, serta berperan dalam mengendalikan respon inflamasi. Aktivasi NF- κ B melibatkan dua jalur pensinyalan utama, jalur kanonik dan non kanonik. Jalur kanonik NF- κ B merespons ligan dari berbagai reseptor sitokin, *pattern recognition receptor* (PRR), anggota superfamily receptor TNF (TNFR), serta reseptor sel-T (TCR) dan reseptor sel-B. PRR mengenali molekul khusus mikroba yaitu *pathogen-associated molecular pattern* (PAMP) dan *damage-associated molecular patterns* (DAMP) yang berasal dari sel yang mengalami kerusakan. PRR melalui kaskade pensinyalan menghasilkan stimulasi respon imun bawaan melalui produksi sitokin inflamasi, seperti IL-1 (Liu *et al.*, 2017).

TLR pada permukaan sel terdapat pada membran plasma dari berbagai jenis sel, termasuk sel imun bawaan yaitu sel dendritik dan makrofag, serta sel non-imun seperti fibroblas dan sel epitel. TLR4 mengenali bakteri lipopolisakarida (LPS). TLR2 bersama dengan TLR1 atau TLR6 mengidentifikasi beragam pola molekuler yang terikat dengan patogen (Kawasaki dan Kawai, 2014).

NF- κ B mengatur aktivasi, diferensiasi dan fungsi efektor sel T, serta memediasi induksi berbagai gen pro-inflamasi pada sel imun bawaan. Peristiwa pensinyalan umum dari PRR adalah aktivasi jalur NF- κ B kanonik yang bertanggung jawab untuk induksi transkripsi sitokin proinflamasi, kemokin, dan mediator inflamasi (Liu *et al.*, 2017).

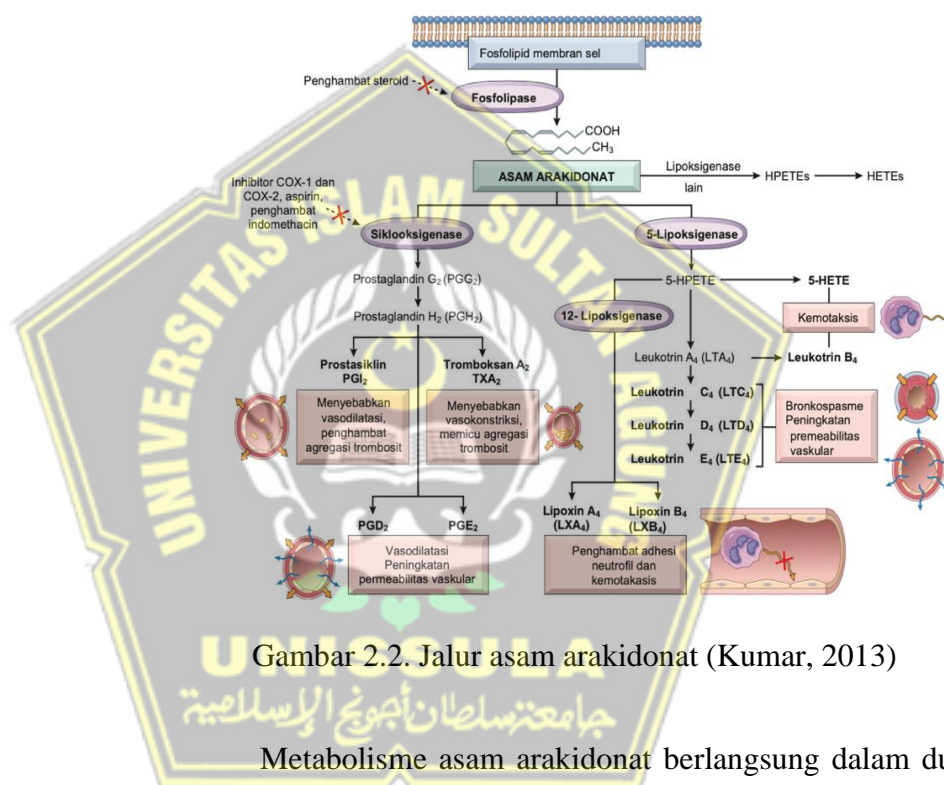


Gambar 2.1. Aktivasi NF- κ B (Abbas *et al.*, 2018)

Aktivasi NF- κ B dapat menginduksi transkripsi beragam gen sehingga dapat mengendalikan proses inflamasi. NF- κ B terutama menginduksi inflamasi dengan secara langsung berpengaruh terhadap kenaikan sintesis kemokin, molekul adhesi dan sitokin inflamasi. Selain itu, NF- κ B juga berperan dalam mengendalikan proliferasi sel, apoptosis, morfogenesis, dan diferensiasi sel (Gambar 2.1) (Liu *et al.*, 2017).

2.2.4.3. Pengaktifan Jalur Asam Arakidonat

Jalur asam arakidonat adalah prekursor dari mediator inflamasi yang menghasilkan prostaglandin sehingga dapat memengaruhi ujung saraf, sel dan pembuluh darah yang terlibat dalam inflamasi (Kumar, 2013).



Gambar 2.2. Jalur asam arakidonat (Kumar, 2013)

Metabolisme asam arakidonat berlangsung dalam dua jalur, yaitu jalur lipoksigenase yang dikatalisis oleh enzim lipoksigenase menghasilkan leukotrien dan lipoksin, dan jalur siklooksigenase yang dikatalisis oleh enzim siklooksigenase menghasilkan prostasiklin, prostaglandin, dan tromboksan (Gambar 2.2). COX-1 dan COX-2 merupakan dua isoenzim yang terdapat pada jalur siklooksigenase. Enzim COX-1 dapat ditemukan pada

jaringan organ seperti paru – paru, ginjal, dan sistem pencernaan, COX-2 tidak ditemukan pada jaringan namun disintesis oleh sel inflamasi selama proses inflamasi. COX-2 terlibat pada proses inisiasi dan resolusi inflamasi. Produksi COX-2 dipicu oleh rangsangan, seperti IL-1. COX-1 tetap ada namun relatif sedikit apabila dibandingkan dengan COX-2 (Abbas *et al.*, 2016).

Hasil akhir proses siklooksigenase yaitu *thromboxane* A₂ (TXA₂), prostaglandin E₂ (PGE₂), prostaglandin 2 (PGD₂), dan *prostacyclin* (PGI₂). PGD₂ adalah turunan signifikan yang diproduksi oleh sel mast melalui jalur siklooksigenase; PGD₂ beserta PGE₂ dan PGF₂ α mengakibatkan pelebaran pembuluh darah dan berperan dalam perkembangan edema. Peningkatan suhu tubuh dan rasa nyeri juga dipengaruhi oleh prostaglandin (Kumar *et al.*, 2013). Inflamasi yang terjadi terus menerus dapat menyebabkan kerusakan jaringan dan menjadi peran dasar atas berbagai macam dasar penyakit (Abbas *et al.*, 2016).

2.3. Daun Salam

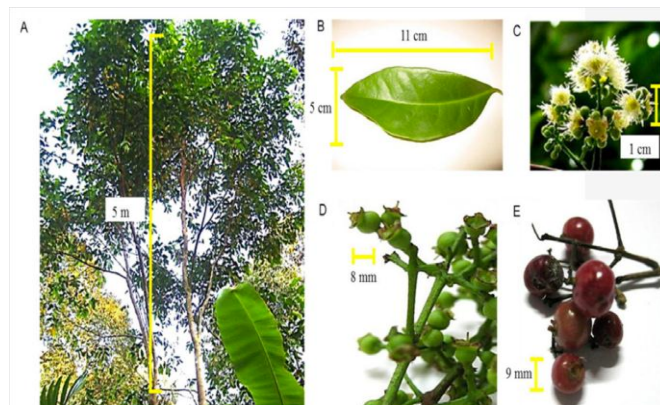
2.3.1. Secara Umum

Nama ilmiah daun salam adalah *Syzygium polyanthum*. Daun salam selain dimanfaatkan sebagai salah satu bahan makanan pokok, juga dapat digunakan sebagai pengobatan (Ismail dan Wan Ahmad, 2019). Menurut ilmu taksonomi tumbuh-tumbuhan, *Syzygium polyanthum* diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom : *Plantae*
 Divisi : *Magnoliophyta*
 Kelas : *Magnoliopsida*
 Ordo : *Myrtales*
 Familia : *Myrtaceae*
 Genus : *Syzygium*
 Spesies : *Syzygium polyanthum*
 (MyBIS, 2023)

2.3.2. Morfologi

Salam (*Syzygium polyanthum*) telah menyebar ke negara-negara Asia Tenggara yaitu Malaysia, Thailand, Indonesia dan Singapura. Tumbuhan ini banyak ditemukan di daerah perbukitan dan hutan (Ismail dan Wan Ahmad, 2019).



Gambar 2.1. Morfologi daun salam (*Syzygium polyanthum*) (Ismail dan Wan Ahmad, 2019)

Tinggi pohon salam dapat mencapai 5 meter, memiliki akar yang lurus dan batang membulat dengan dahan yang lebat (Gambar 2.3A). Daun salam memiliki bentuk elips dengan panjang 5 sampai 15 cm dan lebar antara 3 sampai 8 cm, dengan pangkal dan ujung daun runcing (Gambar 2.3B). Salam memiliki tangkai daun sekitar 0,5 - 1 cm (Ismail dan Wan Ahmad, 2019).

2.3.3. Kandungan Daun Salam

Penelitian yang telah dilakukan oleh Dewijanti (2019) terkait skrining fitokimia ekstrak etanol daun salam didapatkan hasil :

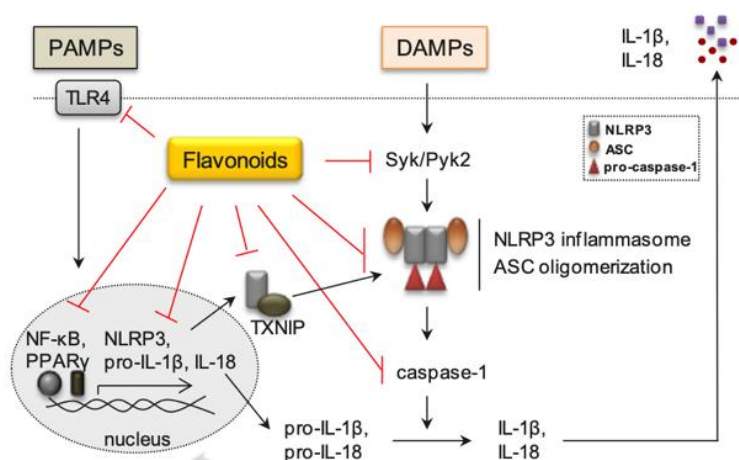
Tabel 2.1 Skrining hasil uji fitokimia ekstrak etanol daun salam
(Dewijanti *et al.*, 2019)

No.	Uji	Ekstrak Etanol	
		70%	96%
1.	Alkaloids	+++	++
2.	Dragendrof		
3.	Flavonoids	++	+
4.	Saponin	+	+++
5.	Tanin	++	++
6.	Quinons	+	+
7.	Terpenoids	+	++

++ : terdapat fitokimia melimpah
 +++ : terdapat fitokimia sangat melimpah

1. Flavonoid

Flavonoid memiliki struktur umum C₆ – C₃ – C₆, dan dihubungkan oleh rantai tiga karbon. Peran flavonoid sebagai anti inflamasi melalui modulasi ekspresi molekul proinflamasi seperti enzim COX-2, *inducible nitric oxide synthase* (iNOS), dan sitokin proinflamasi seperti IL-1.

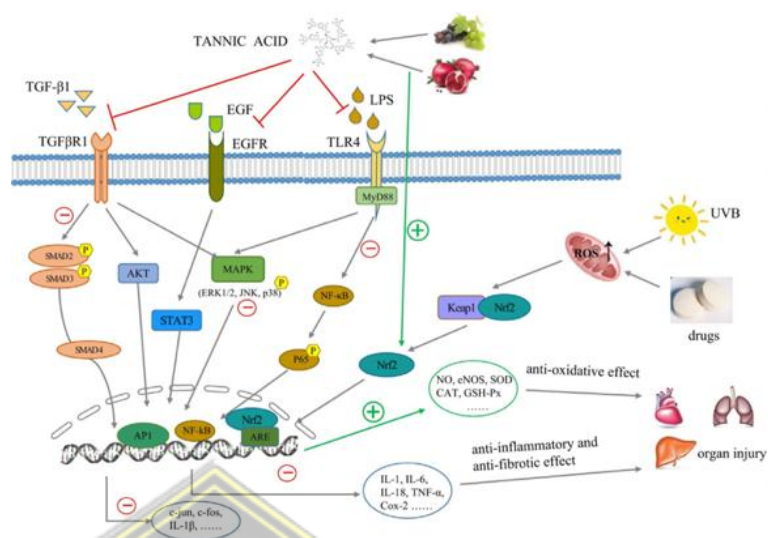


Gambar 2.2. Mekanisme penghambatan inflamasi oleh flavonoid (Lim *et al.*, 2019)

Kandungan flavonoid berperan menghambat produksi sitokin inflamasi dengan cara menghambat aktivasi NLRP3 *inflammasome* serta menghambat caspase 1 sehingga tidak terjadi perubahan pro IL-1 β menjadi IL-1 β . Flavonoid juga menekan aktivasi TLR4 ketika terdapat patogen yang berikatan dengan PAMPs (Gambar 2.4) (Lim *et al.*, 2019).

2. Tannin

Tannin merupakan kelompok senyawa polifenol alami memiliki efek antiinflamasi dengan menghambat NO dan prostaglandin-E2 (PGE2).



Gambar 2.5. Mekanisme Penghambatan Inflamasi Oleh Tanin (Jing *et al.*, 2022)

Tanin meredakan inflamasi melalui beberapa jalur pensinyalan. Tannin menghambat transkripsi gen yang berperan pada jalur NF-κB. Selain itu, tanin juga dapat mengurangi tingkat faktor inflamasi termasuk IL-1 β melalui jalur pensinyalan NF-κB pada Gambar 2.5 (Jing *et al.*, 2022).

3. Saponin

Produksi NO, PGE2 dan sitokin pro-inflamasi yang berlebihan, termasuk IL-1 β dan TNF- α dapat dihambat dengan saponin. Penelitian oleh Jang (2013) menghasilkan bahwa akar *Platycodon grandiflorus* yang mengandung saponin terbukti menekan translokasi NF-κB (Jang *et al.*, 2013).

2.4. Karagenan

Karagenan adalah nama umum untuk polisakarida yang tidak memiliki nilai gizi dan digunakan dalam persiapan makanan untuk sifat pembentuk gel, penebalan dan pengemulsi. Karagenan juga memiliki kegunaan sebagai senyawa untuk pengujian obat anti inflamasi atau menemukan aktivitas inflamasi radang akut yang bertindak sebagai senyawa iritan pada tikus atau mencit karena dapat menyebabkan kerusakan pada daerah yang meradang. Karagenan, senyawa pemicu inflamasi akut atau iritan, diketahui memicu mediator inflamasi seperti prostaglandin, leukotriene, dan bradikinin tanpa merusak jaringan di daerah suntikan (Necas dan Bartosikova, 2013).

Inflamasi yang ditimbulkan oleh karagenan dapat dikategorikan dalam dua fase yang berbeda. Fase awal yaitu edema, tidak dapat ditekan oleh obat antiinflamasi nonsteroid (NSAID) seperti indometasin atau aspirin. Hal ini berkaitan dengan pelepasan histamin, bradykinin, dan 5-hidroksi triptamin (5-HT). Fase akselerasi kedua, edema tidak hanya berkorelasi dengan peningkatan sintesis prostaglandin, namun juga dengan aktivasi siklooksigenase (COX-2). Aktivasi neutrofil lokal dan infiltrasi juga berperan dalam reaksi inflamasi ini dengan menghasilkan zat-zat seperti anion superoksida (O_2^-) dan radikal hidroksil (Necas dan Bartosikova, 2013).

Karagenan melebarkan vena pasca kapiler, menyebabkan sekresi cairan ekstraselular dan sel inflamasi. Proses ini melibatkan pelepasan

beberapa mediator pro-inflamasi. Model tikus yang diinduksi karagenan sensitif terhadap inhibitor siklooksigenase dan berguna untuk mengevaluasi NSAID yang bekerja dengan menghambat siklooksigenase yang terlibat dalam sintesis prostaglandin (Cote *et al.*, 2022).

2.5. Hubungan Ekstrak Daun Salam terhadap Kadar IL-1 pada Tikus Putih Jantan Galur Wistar yang diinduksi Karagenan

Karagenan merupakan senyawa iritan pada model tikus yang akan sensitif terhadap inhibitor siklooksigenase sehingga dapat memicu pelepasan mediator inflamasi, salah satunya adalah sitokin (Necas dan Bartosikova, 2013). Sitokin merupakan produk polipeptida yang diproduksi oleh beragam sel yang berperan sebagai mediator inflamasi dan respons imun, dan IL-1 merupakan sitokin utama pada inflamasi akut (Kumar *et al.*, 2013). NF- κ B yang merupakan faktor transkripsi akan merangsang ekspresi berbagai gen proinflamasi, termasuk yang mengkode sitokin dan kemokin. NF- κ B juga berpartisipasi dalam regulasi peradangan contohnya IL-1 (Liu *et al.*, 2017).

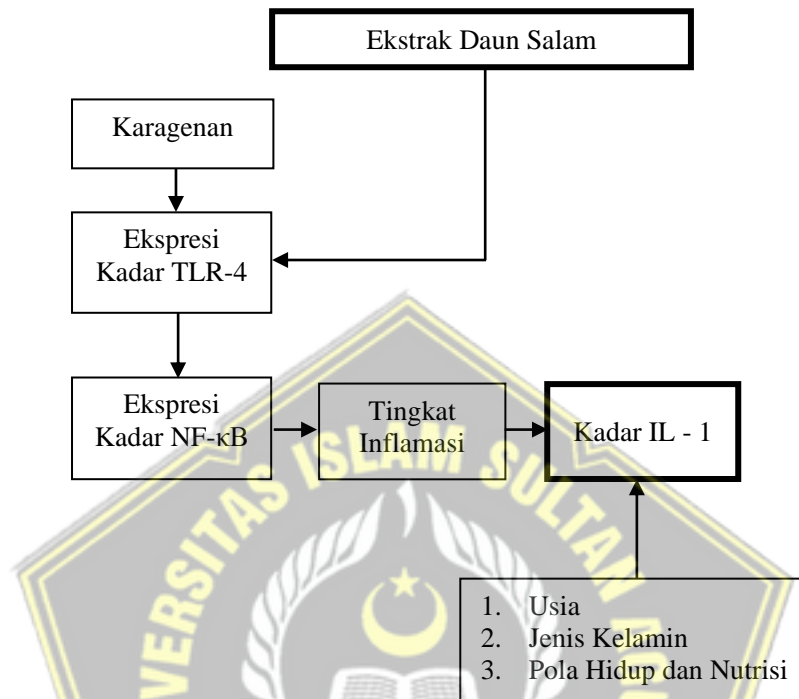
Metabolisme asam arakidonat menghasilkan prostaglandin yang memiliki kemampuan untuk memengaruhi ujung saraf, sel, dan pembuluh darah yang terlibat dalam inflamasi (Abbas *et al.*, 2016). Jalur siklooksigenase dan lipooksigenase yang menghasilkan salah satunya adalah prostaglandin melalui COX-1 dan COX-2 digunakan sebagai petanda terjadinya inflamasi pada jaringan (Kumar *et al.*, 2013). Keadaan inflamasi yang diinduksi oleh karagenan dapat mengaktifasi sekresi IL-1 β dengan cara meregulasi mekanisme seluler dalam membentuk ikatan antara polisakarida ke *pattern*

recognition receptors (PRRs) contohnya *Toll-like receptors* (TLRs). Karagenan mengaktivasi TLR4 yang kemudian menginduksi pembentukan pro IL-1 β menjadi IL-1 β matur sebagai penanda terjadinya inflamasi (Lopes *et al.*, 2020).

Ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*) mengandung komponen bioaktif utama yaitu flavonoid, tanin, dan saponin yang memiliki efek antiinflamasi. Flavonoid beserta tanin memiliki kemampuan untuk menghambat akumulasi siklooksigenase, lipoksigenase dan leukosit (Rizki dan Hariandja, 2013). Kandungan flavonoid, tannin, dan saponin berperan menghambat produksi sitokin inflamasi sehingga tidak terjadi proses inflamasi (Jang *et al.*, 2013; Jing *et al.*, 2022; Lim *et al.*, 2019).

Kegunaan daun salam berhubungan dalam perannya sebagai anti inflamasi, apabila terjadi peningkatan IL-1 akibat inflamasi yang terjadi pada jaringan, maka dengan adanya peran dari flavonoid, tannin dan saponin yang terkandung pada daun dapat berguna dalam menghambat pembentukan IL-1 dalam memicu prostaglandin pada jalur metabolisme asam arakidonat dan NF-kB dalam pembentukan IL-1.

2.6. Kerangka Teori



Gambar 2.6 Kerangka Teori

2.7. Kerangka Konsep



Gambar 2.7 Kerangka Konsep

2.8. Hipotesis

Terdapat pengaruh ekstrak daun salam terhadap kadar Interleukin-1 (IL-1) pada tikus jantan galur wistar yang diinduksi karagenan.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian menggunakan eksperimen laboratorium dan rancangan penelitian *Post – Test Only Control Group Design*. Penelitian eksperimen ini akan melihat pengaruh pemberian ekstrak daun salam terhadap kadar IL-1 pada tikus putih jantan galur wistar yang diinduksi Karagenan.

3.2. Variabel dan Definisi Operasional

3.2.1. Variabel Penelitian

3.2.1.1. Variabel Bebas

Ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*)

3.2.1.2. Variabel Tergantung

Kadar Interleukin-1 (IL-1)

3.2.2. Definisi Operasional

3.2.2.1. Ekstrak Daun Salam

Ekstrak daun salam adalah tanaman salam (*Syzygium polyanthum*) yang diperoleh melalui proses ekstraksi dengan pelarut etanol 70% kemudian diberikan ke hewan coba secara per oral menggunakan sonde, dengan dosis dikelompokkan sebagai berikut :

- a. Kelompok Normal : Kelompok uji normal tanpa pemberian ekstrak daun salam

- b. Kelompok Sakit : Kelompok uji kontrol negatif, hanya diinduksi Karagenan 1%
- c. Kelompok Perlakuan 1 : Kelompok perlakuan I, dosis daun salam 100 mg/KgBB + induksi karagenan 1%
- d. Kelompok Perlakuan 2 : Kelompok perlakuan II, dosis daun salam 200 mg/KgBB + induksi karagenan 1%

Skala : Ordinal

3.2.2.2. Kadar Interleukin – 1

Kadar IL-1 adalah darah yang diambil dari sinus orbitalis sebanyak 1,5 ml kemudian diukur menggunakan ELISA. Konsentrasi IL-1 dinilai secara kuantitatif dengan satuan pikogram/mililiter (pg/ml).

Skala : Rasio

3.3. Populasi dan Sampel

3.3.1. Populasi

Populasi penelitian ini adalah Tikus Putih Jantan Galur Wistar (*Rattus norvegicus*) yang dipelihara di Laboratorium Gizi Pusat Studi Pangan dan Gizi (PSPG) Universitas Gadjah Mada.

3.3.2. Sampel

Sampel penelitian dipilih secara acak melalui pedoman WHO terkait penetapan jumlah sampel yaitu 5 ekor tikus per kelompok dengan rumus berikut :

$$p(n-1) \geq 15$$

$$4(n-4) \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 5$$

Keterangan :

p = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah ulangan sampel yang diperlukan

Setiap kelompok akan ditambahkan 1 ekor tikus untuk menghindari *lost to follow*, maka dari itu jumlah sampel penelitian adalah 24 ekor tikus.

3.3.3. Kriteria Inklusi

1. Usia : 2 bulan
2. Berat Badan : 150 – 200 gram

3.3.4. Kriteria Eksklusi

1. Pernah digunakan untuk eksperimen lain
2. Memiliki kelainan anatomis
3. Terdapat luka maupun cacat

3.4. Instrumen dan Bahan Penelitian

3.4.1. Instrumen Penelitian

Instrumen penelitian sebagai berikut :

1. Kandang hewan coba serta tempat pakan dan minum
2. Timbangan hewan
3. Timbangan analitik
4. Plat aluminium
5. *Moisture balance*
6. Pinset dan kuas
7. *Rotary evaporator*
8. *Water bath*
9. *Oven memmert*
10. *Drying oven*
11. Sonde oral
12. Spuit 1cc dan 3cc
13. Mikrohematokrit
14. Mikropipet
15. Mikrotube 1,5ml
16. *Polymerase tube*

17. Kertas Saring
18. Alat – alat gelas laboratorium (gelas ukur, gelas beker, dll.)
19. Spektrofotometer ELISA
20. *ELISA Kit reader*

3.4.2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian sebagai berikut :

1. Hewan coba
2. Pakan standar
3. *Aquades*
4. Serum darah tikus
5. Karagenan 1%
6. Pelarut etanol 70%
7. Ekstrak daun salam yang sudah dibuat dan siap digunakan

3.5. Cara Penelitian

3.5.1. Pengajuan Ethical Clearance

Ethical clearance penelitian diperoleh dari Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang dengan No. 311/VIII/2023/Komisi Bioetik

3.5.2. Pembuatan Ekstrak Daun Salam

3.5.2.1. Pembuatan Simplisia

Pembuatan simplisia daun dimulai dengan pengumpulan daun salam, kemudian dilakukan

pencucian dengan air mengalir dan ditiriskan. Langkah selanjutnya dilakukan pemotongan daun salam menjadi bagian yang lebih kecil dan dilanjutkan pengeringan pada kabinet *dryer* pada suhu $\pm 40^{\circ}\text{C}$ kemudian dikeringkan. Hasil dilanjutkan tahap penghalusan untuk mendapatkan serbuk simplisia dan ditimbang.

3.5.2.2. Pembuatan Ekstrak Daun Salam

Ekstrak daun salam dihasilkan melalui ekstraksi simplisia daun salam menggunakan etanol 70% dengan perbandingan 1 : 5. Spesimen direndam selama 48 jam dalam bejana tertutup pada suhu ruang dan sesekali diaduk. Setelah 48 jam, hasil rendaman dipisahkan menggunakan kertas saring. Tahap ekstraksi dilakukan kembali menggunakan etanol 70% selama 48 jam. Hasil dari kedua ekstraksi tersebut kemudian dimasukkan ke *evaporator* dengan suhu 60°C menghasilkan ekstrak yang lebih pekat dan kental (Sinaga *et al.*, 2014).

3.5.3. Pembuatan Suspensi Karagenan

Larutan Karagenan 1% dibuat dengan melarutkan 0,1 gram karagenan ke dalam larutan fisiologis NaCl hingga 10 ml (larutan fisiologis NaCl 0,9%).

$$\text{Karagenan } 1\% = 1/100 \times 10\text{ml} = 0,1 \text{ ml}$$

3.5.4. Dosis Penelitian

3.5.4.1. Penetapan Dosis Ekstrak Daun Salam

Berikut jumlah besaran dosis ekstrak daun salam yang diberikan pada hewan coba :

- a. Besaran dosis ekstrak salam 100 mg/kgBB/hari

$$\rightarrow 200/1000 \times 100 = 20 \text{ mg}/200\text{gBB}$$

$$(0,02 \text{ ml}/200\text{gBB})$$

- b. Besaran dosis ekstrak salam 200 mg/kgBB/hari

$$\rightarrow 200/1000 \times 200 = 40 \text{ mg}/200\text{gBB}$$

$$(0,04 \text{ ml}/200\text{gBB})$$

3.5.4.2. Penetapan Dosis Karagenan

Konsentrasi karagenan yang digunakan adalah 1%.

Pada pembuatan larutan karagenan 1%, sebanyak 0,1 gram karagenan ditimbang, dan dilarutkan dalam larutan fisiologis NaCl hingga mencapai 10ml (larutan fisiologis NaCl 0,9%). Larutan ini kemudian disuntikkan secara

intravena ke ekor tikus sebanyak 0,1mL (Saputri dan Zahara, 2016).

3.5.5. Pemberian Perlakuan

1. KN : Kelompok uji kontrol normal, tikus putih jantan galur Wistar diberi diet pakan standar
2. KS : Kelompok uji kontrol negatif, tikus putih jantan galur Wistar diberi pakan standar + diinduksi karagenan 1% dosis 0,1ml.
3. KP1 : Kelompok perlakuan I, tikus putih jantan galur Wistar diberi diet pakan standar + ekstrak daun salam 100 mg/kgBB + diinduksi karagenan 1% dosis 0,1 ml, 30 menit setelah pemberian daun salam
4. KP2 : Kelompok perlakuan II, tikus putih jantan galur Wistar diberi diet pakan standar + ekstrak daun salam 200 mg/kgBB + diinduksi karagenan 1% dosis 0,1 ml, 30 menit setelah pemberian daun salam

3.5.6. Prosedur Pengambilan Darah Tikus

3.5.6.1. Prosedur Pengambilan Darah Tikus

Pengambilan darah dilakukan di sinus orbitalis tikus, 24 jam pasca induksi karagenan 1%. Darah kemudian dimasukkan pada tabung dengan antikoagulan EDTA 1,5 ml.

3.5.7. Pemeriksaan Kadar Interleukin – 1

1. Sampel, reagen, dan larutan standar dipersiapkan. Reagen dipastikan sudah mencapai suhu lingkungan sebelum digunakan.
2. *Strip* ditempatkan ke bingkai sesuai dengan jumlah yang diinginkan untuk pengujian.
3. 50 µl larutan standar ditambahkan pada *well standar*.
4. 40 µl larutan sampel ditambahkan pada *well sampel*, kemudian pada *well sampel* yang sama ditambahkan 10 µl antibodi anti IL-1. 50 µl streptavidin-HRP diberikan pada *well sampel* dan *well standar*.
5. *Well* diaduk dan *plate* ditutup
6. *Plate* ditempatkan dalam inkubator dan disimpan selama 60 menit pada suhu 37 °C. Selanjutnya, segel dibuka dan *plate* dibersihkan secara menyeluruh dengan direndam pada *wash buffer*. Tahap ini diulang sebanyak lima kali. Selanjutnya *well* dibilas dengan 0,35 ml *wash buffer* selama 1 menit tiap pembilasan.
7. 50 µl ditambahkan masing masing 50 µl larutan substrat A dan substrat B ke dalam *well* dan ditutup menggunakan segel baru.

8. *Plate* ditempatkan pada inkubator tanpa cahaya selama 10 menit pada suhu 37 °C. Selanjutnya, 50 µl larutan *stop* dimasukkan ke dalam setiap *well*
9. Dilakukan pengamatan transisi warna yang nyata dari biru ke kuning.
10. Kadar IL-1 diperiksa dengan menggunakan ELISA *Kit Reader* dengan panjang gelombang 450 nm .

3.6. Tempat dan Waktu Penelitian

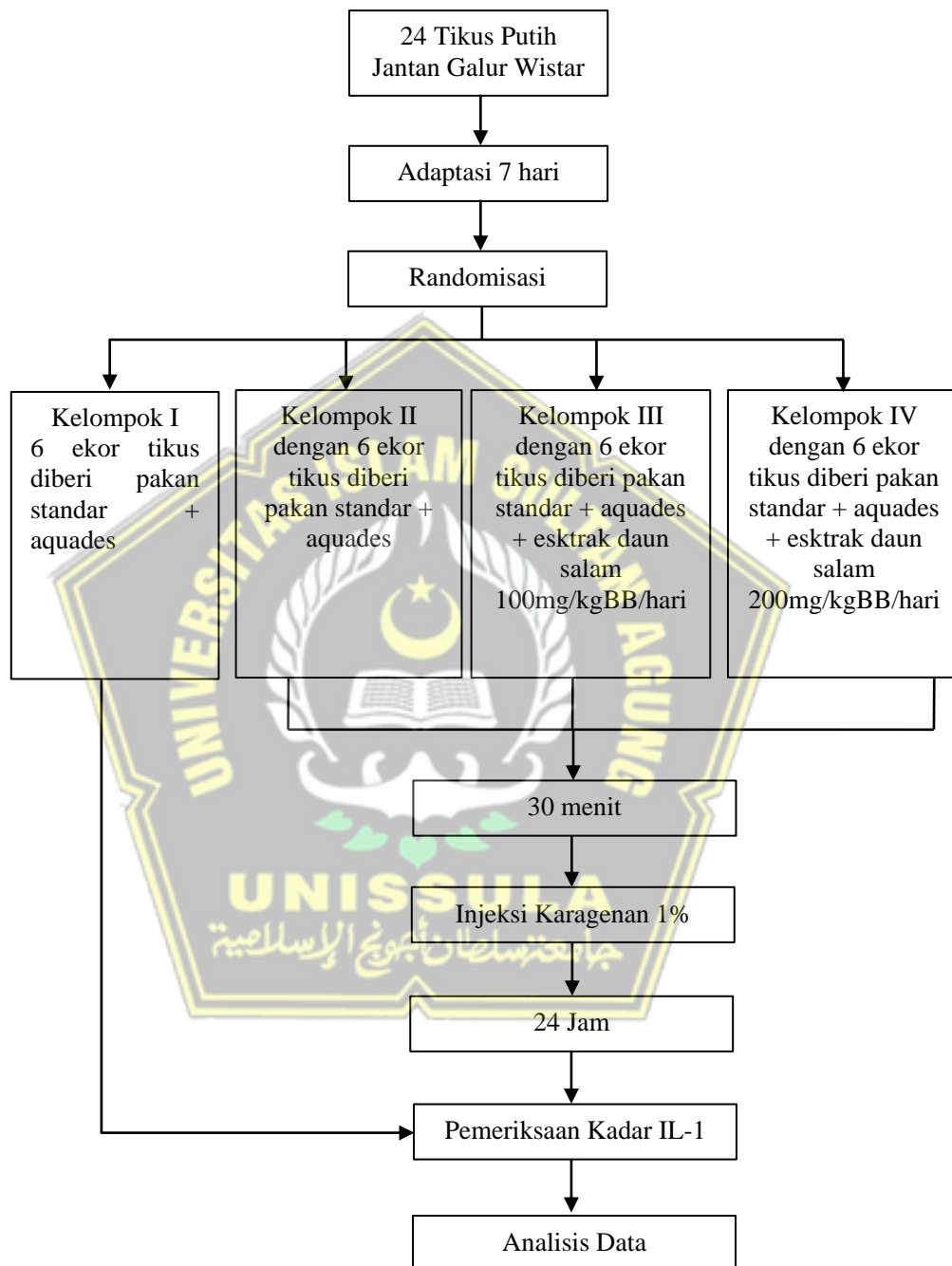
3.6.1. Tempat

Perlakuan hewan coba dan proses perhitungan kadar IL-1 dilakukan di Laboratorium Gizi Pusat Studi Pangan dan Gizi (PSPG) Universitas Gadjah Mada (UGM).

3.6.2. Waktu

Penelitian ini dilakukan pada bulan Agustus 2023.

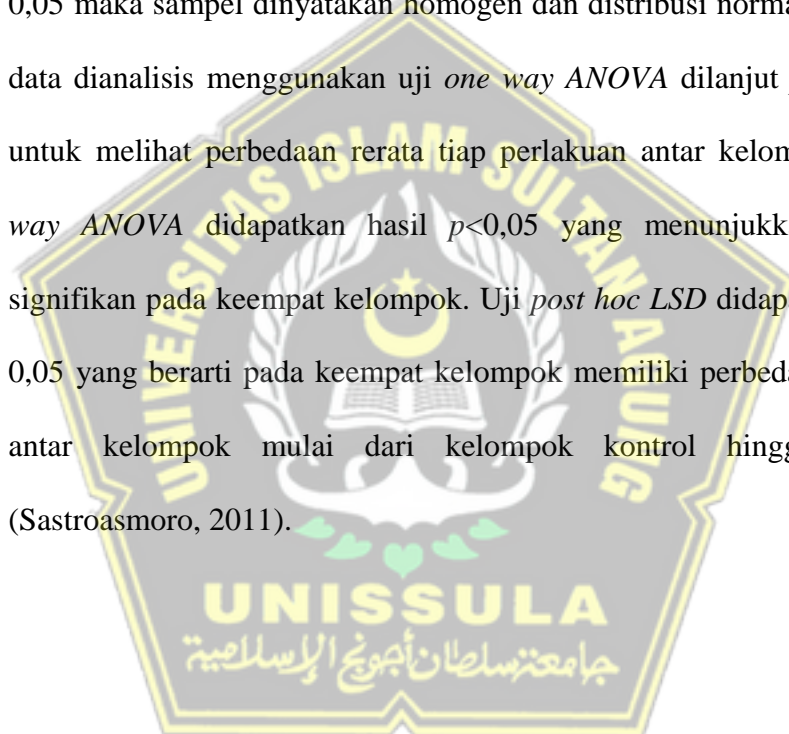
3.7. Alur Penelitian



Gambar 3.1. Alur Penelitian

3.8. Analisis Data

Kadar IL-1 ditentukan menggunakan teknik ELISA untuk menghitung data. Pengujian data diawali dengan uji parametrik *Shapiro-Wilk* dan uji *Levene* untuk menilai normalitas dan homogenitas data. Uji tersebut dipilih karena jumlah sampel ≤ 50 dan skala data dari variabel IL-1 adalah rasio. Uji *Shapiro-Wilk* dan uji *Levene* menghasilkan nilai $p > 0,05$ maka sampel dinyatakan homogen dan distribusi normal, selanjutnya data dianalisis menggunakan uji *one way ANOVA* dilanjut *post hoc LSD* untuk melihat perbedaan rerata tiap perlakuan antar kelompok. Uji *one way ANOVA* didapatkan hasil $p < 0,05$ yang menunjukkan perbedaan signifikan pada keempat kelompok. Uji *post hoc LSD* didapatkan hasil $p < 0,05$ yang berarti pada keempat kelompok memiliki perbedaan signifikan antar kelompok mulai dari kelompok kontrol hingga perlakuan (Sastroasmoro, 2011).



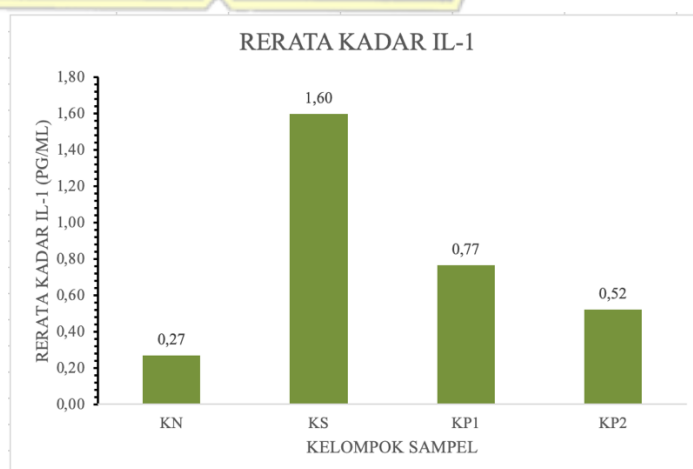
BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Penelitian

4.1.1. Deskriptif Data

Penelitian ini dilakukan menggunakan 24 ekor tikus putih jantan galur wistar yang secara acak terbagi menjadi 4 kelompok. Kelompok Normal (KN) diberi pakan standar dan aquades; Kelompok Sakit (KS) diberi pakan standar, aquades dan induksi Karagenan 1% ; Kelompok Perlakuan 1 (KP1) diberi pakan standar, aquades, ekstrak daun salam 100 mg/kgBB dan induksi Karagenan 1% ; Kelompok Perlakuan 2 (KP2) diberi pakan standar, aquades, ekstrak daun salam 200 mg/kgBB dan induksi Karagenan 1%. Hasil rerata kadar IL-1 pada setiap kelompok ditunjukkan pada gambar 4.1. Hingga akhir penelitian tidak ada hewan coba yang *drop out*.



Gambar 4.1 Hasil Rerata Kadar IL-1 pada setiap kelompok penelitian

Kadar IL-1 tertinggi yaitu pada KS dengan rerata sebesar 1,60 pg/ml dan terendah pada KN dengan rerata sebesar 0,27 pg/ml. Kelompok perlakuan, KP1 dan KP2 memiliki rerata kadar IL-1 yang lebih rendah dibandingkan dengan KS. Rerata kadar IL-1 pada KS dengan jumlah 1,60 pg/ml dibandingkan dengan KP1 terjadi penurunan kadar IL-1 menjadi 0,77 pg/ml, sedangkan pada KP2 terjadi penurunan kadar IL-1 menjadi 0,52 pg/ml. Namun, diantara kelompok perlakuan, KP2 terlihat lebih rendah apabila dibandingkan dengan KP1.

4.1.2. Analisa Data

Data masing – masing kelompok dilakukan uji *Shapiro-Wilks* untuk uji normalitas dan Uji *Levene* untuk uji homogenitas. Hasil uji normalitas pada tiap kelompok terpenuhi ($p > 0,05$) dan varian data homogen ($p > 0,05$) sehingga dinyatakan untuk keempat kelompok tersebut memenuhi syarat uji hipotesis menggunakan uji parametrik *One Way Anova*. Uji analisis varians ANOVA menghasilkan nilai $p = 0,000$ ($p < 0,05$), maka pada penelitian ini terdapat perbedaan signifikan kadar IL-1 antar keempat kelompok penelitian. Hasil pengujian analisis statistik dapat dilihat pada tabel 4.1. Analisis lanjut untuk mengetahui uji

beda antar kelompok dengan uji analisis post hoc LSD sesuai dengan tabel 4.2.

Tabel 4.1 Hasil Analisa Uji Normalitas, Homogenitas, dan One Way ANOVA

Tabel	Kelompok	p-value		
		Shapiro-Wilk	Levene	One Way Anova
4.2	KN	0,804*	0,546**	0,000
	KS	0,966*		
	KP1	0,791*		
	KP2	0,835*		

Analisis Uji post hoc LSD

Kelompok		Post Hoc LSD
KN	KS	0,000*
	KP1	0,000*
	KP2	0,000*
KS	KP1	0,000*
	KP2	0,000*
KP1	KP2	0,000*

Keterangan : * = ada perbedaan signifikan pada semua pasangan kelompok

Hasil uji *Post Hoc LSD* pada KS dan KN berbeda signifikan ($p < 0,05$) dan menunjukkan rerata KS lebih tinggi dibandingkan dengan KN. KP1 dan KP2 mempunyai nilai $p < 0,05$ terhadap KN yang menunjukkan rerata kadar IL-1 antar kelompok tersebut berbeda signifikan. Pada kelompok KS dibandingkan dengan KP1 dan KP2, didapatkan $p < 0,05$ sehingga menunjukkan perbedaan yang signifikan antar kelompok serta rerata yang lebih rendah pada KP1 dan KP2. Kelompok perlakuan KP1

dan KP2 didapatkan perbedaan signifikan $p < 0,05$ dengan rerata kelompok KP2 lebih rendah.

4.2 Pembahasan

Rerata kadar IL-1 KS (1,60 pg/ml) lebih tinggi dibandingkan dengan KN (0,27 pg/ml) dan berbeda signifikan ($p < 0,05$) yang menunjukkan bahwa penelitian ini berhasil membuat kadar IL-1 meningkat pada hewan uji pada kelompok sakit (KS) dengan induksi Karagenan 1%. Hal ini sejalan dengan teori bahwa pemberian karagenan 1% akan menginduksi terjadinya inflamasi sehingga memicu aktivasi ekspresi TLR-4 dan NF- κ B, dan terjadi peningkatan kadar IL-1 (Lopes *et al.*, 2020). Penelitian yang dilakukan oleh Necas (2013), menunjukkan bahwa pemberian karagenan yang merupakan senyawa iritan pada model tikus akan sensitif terhadap jalur asam arakidonat dan siklooksigenase sehingga dapat memicu pelepasan mediator inflamasi.

Efek pemberian ekstrak daun salam dapat dilihat pada kelompok perlakuan (KP1 dan KP2) yang memiliki rerata kadar IL-1 lebih rendah apabila dibandingkan KS dengan nilai $p < 0,05$ memiliki perbedaan signifikan. Hal ini menandakan ekstrak daun salam pada penelitian ini memiliki potensi sebagai anti inflamasi dan sejalan dengan penelitian Amirah (2020) bahwa daun salam sebagai antiinflamasi dapat menghambat enzim siklooksigenase pada jalur metabolisme asam arakidonat dan transkripsi gen yang bergantung pada jalur NF- κ B. Aktivasi NF- κ B dapat menginduksi transkripsi beragam gen sehingga dapat mengendalikan proses inflamasi dengan secara langsung

berpengaruh terhadap kenaikan sintesis kemokin, molekul adhesi dan sitokin inflamasi salah satunya adalah IL-1 (Liu *et al.*, 2017).

Kelompok perlakuan KP1 dan KP2 menunjukkan hasil berbeda signifikan ($p < 0,05$) dan KP2 memiliki pengaruh lebih tinggi terhadap penurunan IL-1 akibat penggunaan dosis daun salam yang lebih tinggi. Perbandingan Kelompok Perlakuan (KP1 dan KP2) dengan KS didapatkan hasil berbeda signifikan ($p < 0,05$), namun rerata pada kelompok perlakuan belum masih berbeda signifikan dengan KN. Hal ini sejalan dengan penelitian bahwa Ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*) yang mengandung komponen bioaktif utama yaitu flavonoid, tanin, dan saponin berperan dengan cara menekan aktivasi TLR4, sehingga translokasi jalur pensinyalan NF-kB dapat mengurangi pelepasan mediator pro inflamasi, salah satunya sitokin IL-1 dan tidak terjadi proses inflamasi (Jang *et al.*, 2013; Jing *et al.*, 2022; Lim *et al.*, 2019).

Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak daun salam berpengaruh terhadap kadar IL-1 dan bersifat preventif terhadap inflamasi yang diinduksi karagenan 1%. Keterbatasan dalam penelitian ini yaitu hanya dilakukan pemeriksaan kadar IL-1 dengan dosis 100 mg/KgBB dan 200 mg/KgBB yang menunjukkan bahwa variasi dosis yang digunakan pada penelitian ini belum sebanding dengan kadar IL-1 pada Kelompok Normal, sehingga perlu optimalisasi dosis ekstrak daun salam. Keterbatasan dalam penelitian ini yaitu tidak dilakukan uji kandungan ekstrak daun salam

sehingga peneliti tidak dapat mengetahui kandungan yang memiliki pengaruh paling besar terhadap penurunan tingkat inflamasi yang terjadi.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

- 5.1.1 Ekstrak daun salam berpengaruh terhadap kadar Interleukin-1 pada tikus putih jantan galur wistar yang diinduksi karagenan
- 5.1.2 Rerata kadar IL-1 pada tikus putih jantan galur wistar yang diberi diet pakan standar adalah sebesar 0,27 pg/ml.
- 5.1.3 Rerata IL-1 pada tikus putih jantan galur wistar yang diinduksi Karagenan 1% adalah sebesar 1,60 pg/ml.
- 5.1.4 Rerata kadar IL-1 pada tikus putih jantan galur wistar yang diberi ekstrak daun salam 100 mg/kgBB kemudian diinduksi Karagenan 1% adalah 0,77 pg/ml.
- 5.1.5 Rerata kadar IL-1 pada tikus putih jantan galur wistar yang diberi ekstrak daun salam 200 mg/kgBB kemudian diinduksi Karagenan 1% adalah 0,52 pg/ml.
- 5.1.6 Hasil analisis statistik antar kelompok percobaan didapatkan tiap perbandingan memiliki nilai $p < 0,05$ yang berarti terdapat perbedaan signifikan.

5.2. Saran

- 5.2.1 Penelitian terkait uji kandungan ekstrak daun salam untuk mengetahui senyawa yang memiliki pengaruh paling besar terhadap kadar IL-1 pada tikus putih jantan galur wistar yang diinduksi karagenan.
- 5.2.2 Penelitian dengan peningkatan dosis ekstrak daun salam untuk mengetahui efek optimal terhadap kadar IL-1 pada tikus jantan galur wistar yang diinduksi karagenan.



DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A. K., Litchman, A. H., dan Pillai, S. (2018). *Cellular And Molecular Immunology* (9th ed.). Elsevier.
- Abbas, A. K., Litchman, A. H., dan Shiv, P. (2016). *Basic Immunology : Functions and Disorders of the Immune System* (6th ed.). Elsevier.
- Agustina, R., Tita Indrawati, D., dan Amir Masruhin, M. (2015). Aktivitas Ekstrak Daun Salam (*Eugenia Polyantha*) Sebagai Antiinflamasi Pada Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*). *Journal of Tropical Pharmacy and Chemistry* , 3(2). 120 – 123. <http://doi.org/10.25026/jtpc.v3i2.96>.
- Amirah, S., Wati, A., *et al.* (2020). Aktivitas Ekstrak Daun Salam (*Syzygium polyanthum*) sebagai Anti Rheumatoid Arthritis pada Tikus yang Diinduksi *Complete Freund's Adjuvants* (CFA). *Jurnal Farmasi Galenika* (e-Journal), 6(1), 77–83. <https://doi.org/10.22487/j24428744.2020.v6.i1.14581>
- Batool, S., Khera, R. A., *et al* (2019). Bay Leaf. In *Medicinal Plants of South Asia: Novel Sources for Drug Discovery* (pp. 63–74). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-102659-5.00005-7>
- Cahyaningsih, E., Era Sandhi, P. K., dan Muthia Susanthi, I. (2018). Uji Efek Antiinflamasi Ekstrak Etanol Daun Salam India (*Murraya Koenigii* L) terhadap Tikus (*Rattus Norvegicus*) Jantan yang Diinduksi Karagenan 1%. In *Jurnal Ilmiah Medicamento* (Vol. 4, Issue 1). 25–31. <https://doi.org/10.36733/medicamento.v4i1.875>.
- Casimir, G. J., Heldenbergh, F., *et al* (2010). Gender Differences And Inflammation: An In Vitro Model of Blood Cells Stimulation In Prepubescent Children. *Journal of Inflammation*, 7(28). <https://doi.org/10.1186/1476-9255-7-28>
- Cote, B., Elbarbry, F., *et al.* (2022). Mechanistic Basis for the Role of Phytochemicals in Inflammation - Associated Chronic Diseases. In *Molecules* (Vol. 27, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules27030781>
- Dewijanti, I. D., Mangunwardoyo, W., *et al.* (2019). Bioactivities of Salam leaf (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp). *AIP Conference Proceedings*, 2168 (1) : 020072 <https://doi.org/10.1063/1.5132499>

- Fauzi, A. (2019). *Rheumatoid Arthritis*. Vol. 3 No. 1
<https://doi.org/10.23960/jkunila31167-175>
- Ismail, A., dan Wan Ahmad (2019). *Syzygium polyanthum* (Wight) Walp: A potential phytomedicine. *Pharmacognosy Journal*, 11(2), 429–438.
<https://doi.org/10.5530/pj.2019.11.67>
- Jang, K. J., Ki Kim, H., *et al.* (2013). Cyto Anti-Inflammatory Effects Of Saponins Derived From The Roots Of Platycodon Grandiflorus In Lipopolysaccharide-Stimulated BV2 Microglial Cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 31(6), 1357–1366.
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2013.1330>
- Jing, W., Xiaolan, C., *et al* (2022). Pharmacological effects and mechanisms of tannic acid. *International Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 154). Elsevier Masson s.r.l.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113561>
- Kaneko, N., Kurata, M., Yamamoto, T., *et al* (2019). The Role Of Interleukin-1 In General Pathology. In *Inflammation and Regeneration* (Vol. 39, Issue 1). Biomed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s41232-019-0101-5>
- Kantor, E. D., Lampe, J. W., *et al* (2013). Lifestyle Factors and Inflammation: Associations by Body Mass Index. *Plos ONE*, 8(7).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067833>
- Kumar, V., Abbas, A. K., dan Aster, J. C. (2013). *Buku Ajar Patologi Robbins* (9th ed.). Elsevier.
- Liliwirianis N. (2011). Preliminary Studies on Phytochemical Screening of Ulam and Fruit from Malaysia. *E-Journal of Chemistry*, 8(S1), 285–288. <http://doi.org/10.1155/2011/464595>
- Lim, H., Heo, M. Y., dan Kim, H. P. (2019). Flavonoids: Broad Spectrum Agents On Chronic Inflammation. In *Biomolecules and Therapeutics* (Vol. 27, Issue 3, pp. 241–253). Korean Society of Applied Pharmacology. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2019.034>
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., dan Sun, S. C. (2017). *NF-kb Signaling In Inflammation in Signal Transduction And Targeted Therapy* (Vol. 2). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
- Lopes, A. H., Silva, R. L., Fonseca, M. D., *et al* (2020). Molecular Basis Of Carrageenan-Induced Cytokines Production In Macrophages. *Cell Communication and Signaling*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00621-x>

- Myers, M. J., Deaver, C. M., dan Lewandowski, A. J. (2019). Molecular Mechanism Of Action Responsible For Carrageenan-Induced Inflammatory Response. *Molecular Immunology*, 109, 38–42. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.02.020>
- Necas, J., dan Bartosikova, L. (2013). Carrageenan: a review. In *Veterinari Medicina* (Vol. 58, Issue 4). 187 – 205. <https://doi.org/10.17221/6758-VETMED>.
- Salsabila, S. A., dan Sudiono, J. (2022). Efek Antiinflamasi Ekstrak Kulit Tamarillo: Pemeriksaan Kadar IL-6 Tikus Pasca Induksi Karagenin. *Jurnal Biomedika Dan Kesehatan*, 5(2), 75–81. <https://doi.org/10.18051/jbiomedkes.2022.v5.75-81>
- Sanada, F., Taniyama, Y., *et al* (2018). Source of Chronic Inflammation in Aging. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 5. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00012>
- Saputri, F. C., dan Zahara, R. (2016). Uji Aktivitas Anti-Inflamasi Minyak Atsiri Daun Kemangi (*Ocimum americanum* L.) Pada Tikus Putih Jantan yang Diinduksi Karagenan (Vol. 3, Issue 3). 107 – 119.
- Sinaga, A. F., Bodhi, W., dan Lolo, W. A. (2014). Uji Efek Ekstrak Etanol Daun Salam (*Syzygium polyanthum* (Wight.) Walp) Terhadap Penurunan Kadar Asam Urat Tikus Putih Jantan Galur Wistar (*Rattus Norvegicus* L.) Yang Diinduksi Potasium Oksonat. In *Pharmakon Jurnal Ilmiah Farmasi-UNSRAT* (Vol. 3, Issue Mei). <https://doi.org/10.35799/pha.3.2014.5455>
- Tortora, G. J., dan Derrickson, B. (2017). *Principles of anatomy and physiology*. Fifteenth edition; Wiley Loose-Leaf Print Companion. Hoboken, New Jersey, John Wiley and Sons, Inc.
- Vos, T., Lim, S. S., Abbafati, C., *et al* (2020). Global Burden Of 369 Diseases And Injuries In 204 Countries And Territories, 1990–2019: A Systematic Analysis For The Global Burden Of Disease Study 2019. *The Lancet*, 396(10258), 1204–1222. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30925-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30925-9)
- Wiebe, N., Muntner, P., dan Tonelli, M. (2022). Associations Of Body Mass Index, Fasting Insulin, And Inflammation With Mortality: A Prospective Cohort Study. *International Journal of Obesity*, 46(12), 2107–2113. <https://doi.org/10.1038/s41366-022-01211-2>