

**PENGARUH EKSTRAK AKAR ASHWAGANDHA
(*Withania Somnifera*) TERHADAP KADAR SUPER
OKSIDA DISMUTASE DAN INTERLEUKIN-6
(Studi Eksperimen pada Tikus Wistar yang Diinduksi
D-Galaktose dan Diet Tinggi Lemak)**

TESIS

Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Magister (S2)



Magister Ilmu Biomedik

Angga Arinda Hartaaji

MBK 24.30.010426

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG
2025**

TESIS

**PENGARUH EKSTRAK AKAR ASHWAGANDHA (*Withania
Somnifera*) TERHADAP KADAR SUPER OKSIDA
DISMUTASE DAN INTERLEUKIN-6
(Studi Eksperimen pada Tikus Wistar yang Diinduksi
D-Galaktose dan Diet Tinggi Lemak)**

Disusun Oleh
Angga Arinda Hartaaji
MBK 24.30.010426

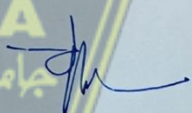
Telah dipertahankan di depan Tim penguji pada bulan 1 September 2025 dan
dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui

Pembimbing I

Pembimbing II


Prof. Dr. Siti Thomas Zulaikhah, S.K.M., M.Kes
NIP. 210109119


Dr. dr. Joko WW, MKes
NIP. 210198046

Mengetahui,

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung


Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B, FINACS
NIP. 210123106

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri di dalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan Lembaga Pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum/tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, 22 Juni 2025



Angga Arinda Hartaaji



RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Angga Arinda Hartaaji
Tempat/Tanggal Lahir : Samarinda, 13 Juli 1986
Agama : Katolik
Jenis Kelamin : Laki-laki

B. Riwayat Pendidikan

1. TK Kristus Raja Surabaya : Lulus Tahun 1992
2. SD Santo Yusup Bandung : Lulus Tahun 1998
3. SMP Don Bosco Jakarta : Lulus Tahun 2001
4. SMA Don Bosco Jakarta : Lulus Tahun 2004
5. S1 FK Universitas Pelita Harapan : Lulus Tahun 2009
6. Profesi Dokter Universitas Pelita Harapan : Lulus Tahun 2011
7. Magister Ilmu Biomedis FK Unissula : Lulus Tahun 2024-sekarang

C. Riwayat Keluarga

1. Nama Istri : Herdiningtyas Oktaviantri
2. Nama Anak : Bernadette Anindhy Hartaaji
Brigitta Arumi Hartaaji
Benedict Andaru Hartaaji

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah Rabbil Alamin, puji dan syukur kehadiran Allah SWT atas segala Rahmat dan Karunia-Nya, akhirnya penulis dapat menyelesaikan penyusunan tesis yang berjudul Pengaruh Ekstrak Akar Ashwagandha (*Withania Somnifera*) Terhadap Kadar Super Oksida Dismutase dan Interleukin-6 (Studi Eksperimen pada Tikus Wistar yang Diinduksi D-Galaktose dan Diet Tinggi Lemak).

Tesis ditulis dalam rangka memenuhi persyaratan untuk memperoleh gelar Magister Biomedik (M. Biomed) di Sekolah Pascasarjana Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

Penulis menyadari bahwa tesis dapat diselesaikan berkat dukungan dan bantuan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis berterima kasih kepada semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung memberikan kontribusi dalam menyelesaikan tesis ini.

Selanjutnya ucapan terimakasih yang setulus – tulus penulis sampaikan kepada :

1. Prof. Dr. H. Gunarto, SH., M.Hum selaku rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang beserta para wakil rektor yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk menempuh dan menyelesaikan pendidikan Magister Ilmu Biomedik.
2. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S.H. Sp. KF selaku dekan Fakultas Kedokteran UNISSULA yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti pendidikan di program Magister Biomedik

3. Dr.dr. Eko Setiawan, Sp.B, FINACS selaku ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik yang telah memberikan kesempatan penulis untuk mengikuti pendidikan di Prodi Biomedik.
4. Tim pembimbing : Prof. Dr. Siti Thomas Zulaikhah, S.K.M., M.Kes dan Dr.dr. Joko WW, MKes yang telah membimbing dengan segenap ilmu, waktu, tenaga dalam menyusun tesis ini.
5. Tim penguji : Dr. dr. Chodidjah, M.Kes, Dr. dr. Eko Setiawan, SpB, FINACS dan Prof. Dr. Atina Husaana, M.Si.Apt.
6. Segenap dosen Ilmu Biomedik
7. Teman – teman S2 yang telah membantu penulis dalam penelitian ini.
8. Semua pihak yang telah banyak membantu penulis dalam menyelesaikan tesis ini.

Semarang, 22 Juni 2025

Angga Arinda Hartaaji

ABSTRAK

Latar Belakang:

Pola makan tinggi gula dan lemak dapat memicu stres oksidatif dan inflamasi kronis tingkat rendah (*inflammaging*), ditandai dengan penurunan enzim antioksidan seperti superoksida dismutase (SOD) serta peningkatan sitokin proinflamasi interleukin-6 (IL-6). Ashwagandha (*Withania somnifera*) memiliki sifat antioksidan dan antiinflamasi sehingga berpotensi memodulasi kedua biomarker tersebut.

Tujuan:

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh pemberian ekstrak akar ashwagandha terhadap kadar SOD dan IL-6 pada tikus yang diinduksi D-Galaktose dan diet tinggi lemak.

Metode:

Penelitian eksperimental dengan desain *post-test only control group* ini menggunakan 24 ekor tikus Wistar jantan yang dibagi menjadi empat kelompok: K1 (sehat), K2 (D-galaktosa + diet tinggi lemak), K3 (D-galaktosa + diet tinggi lemak + Ashwagandha 150 mg/kgBB), dan K4 (D-galaktosa + diet tinggi lemak + Ashwagandha 300 mg/kgBB). Perlakuan diberikan selama 28 hari. Kadar SOD dan IL-6 diperiksa menggunakan metode ELISA dan dianalisis dengan uji ANOVA/Welch serta uji lanjut yang sesuai.

Hasil:

Rerata kadar SOD tertinggi pada K1 ($2,28 \pm 0,131$ ng/L) dan terendah pada K4 ($1,388 \pm 0,047$ ng/L). Ashwagandha dosis 150 mg/kgBB (K3) meningkatkan SOD dibanding kontrol negatif (K2) secara signifikan ($p < 0,001$). Sebaliknya, kadar IL-6 tertinggi terdapat pada K2 ($7,10 \pm 0,46$ ng/L) dan terendah pada K3 ($4,61 \pm 0,51$ ng/L). Ashwagandha menurunkan kadar IL-6 secara signifikan, terutama pada dosis 300 mg/kgBB (K4) dibanding K2 ($p < 0,001$).

Kesimpulan:

Ekstrak akar Ashwagandha pada dosis 150 mg/kgBB mampu meningkatkan kadar SOD dan menurunkan kadar IL-6, dan pada dosis 300mg/KgBB hanya mampu menurunkan kadar IL-6. Temuan ini menunjukkan potensi Ashwagandha sebagai agen antioksidan dan antiinflamasi dalam memodulasi kondisi *inflammaging*.

Kata kunci: Ashwagandha, *Withania somnifera*, inflammaging, SOD, IL-6, ELISA.

ABSTRACT

Background:

High sugar and fat diets can trigger oxidative stress and low-grade chronic inflammation (inflammaging), characterized by decreased antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD) and increased pro-inflammatory cytokines such as interleukin-6 (IL-6). Ashwagandha (*Withania somnifera*) is known for its antioxidant and anti-inflammatory properties, making it a potential modulator of these biomarkers.

Objective:

This study aims to prove the effect of administering ashwagandha root extract on SOD and IL-6 levels in mice induced by D-Galactose and a high-fat diet.

Methods:

This experimental study with a post-test only control group design used 24 male Wistar rats divided into four groups: K1 (healthy), K2 (D-galactose + high-fat diet), K3 (D-galactose + high-fat diet + Ashwagandha 150 mg/kgBW), and K4 (D-galactose + high-fat diet + Ashwagandha 300 mg/kgBW). Treatments were administered for 28 days. SOD and IL-6 levels were measured using ELISA and analyzed with ANOVA/Welch and appropriate post hoc tests.

Results:

The highest mean SOD level was found in K1 (2.28 ± 0.131 ng/L) and the lowest in K4 (1.388 ± 0.047 ng/L). Ashwagandha at 150 mg/kgBW (K3) significantly increased SOD compared to the negative control (K2) ($p < 0.001$). Meanwhile, IL-6 levels were highest in K2 (7.10 ± 0.46 ng/L) and lowest in K3 (4.61 ± 0.51 ng/L). Ashwagandha significantly reduced IL-6, with the strongest effect observed at 300 mg/kgBW (K4) compared to K2 ($p < 0.001$).

Conclusion:

Ashwagandha root extract at dose 150 mg/kgBW increased SOD levels and decreased IL-6 levels, while at dose 300 mg/kgBW, it only decreased IL-6 levels. These findings demonstrate Ashwagandha's potential as an antioxidant and anti-inflammatory agent in modulating inflammaging.

Keywords: Ashwagandha, *Withania somnifera*, inflammaging, SOD, IL-6, ELISA.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN	
PENGESEAHAN	Erro
r! Bookmark not defined.	
PERNYATAAN	Erro
r! Bookmark not defined.	
RIWAYAT HIDUP	iv
KATA PENGANTAR	v
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR SINGKATAN	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan Umum	4
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.4 Originalitas Penelitian.....	4
1.5 Manfaat Penelitian	7
1.5.1 Manfaat Teoritis.....	7
1.5.2 Manfaat Praktis	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	8

2.1 Super Oksida Dismutase (SOD).....	8
2.1.1. Biomolekular.....	8
2.1.2. Fungsi	9
2.1.3. Peran	9
2.1.4. Hubungan SOD dengan berbagai Penyakit	10
2.2 Interleukin-6 (IL-6)	10
2.2.1 Biomolekular.....	11
2.2.2 Fungsi	12
2.2.3 Peran	12
2.2.4 Hubungan IL-6 dalam berbagai Penyakit.....	13
2.3 Penuaan.....	14
2.3.1 Definisi	14
2.3.2 Teori dan Mekanisme Penuaan.....	14
2.3.2 Diet Tinggi Lemak dan Penuaan.....	16
2.3.3 Induksi D-Galaktose dan Inflammaging.....	16
2.4 Stres Oksidatif dan Penuaan.....	17
2.4.1 Definisi Stres Oksidatif	17
2.4.2 Hubungan Antara Stres Oksidatif dan Penuaan.....	18
2.4.3 Kerusakan Oksidatif pada Molekul Biomolekuler	18
2.4.4 Mekanisme Antioksidan dalam Melawan Stres Oksidatif ...	19
2.4.5 Implikasi Klinis Stres Oksidatif dalam Penuaan	19
2.4.6 Strategi Mengurangi Stres Oksidatif	20
2.5 Inflamasi pada Penuaan (<i>Inflammaging</i>).....	20
2.5.1 Definisi	20
2.5.2 Mekanisme Dasar <i>Inflammaging</i>	21
2.5.3 Biomarker <i>Inflammaging</i>	22
2.6 Ashwagandha	24

2.6.1	Komponen Bioaktif Ashwagandha	25
2.6.2	Aktivitas Antioksidan Ashwagandha	26
2.6.3	Aktivitas Anti-Inflamasi Ashwagandha	26
2.6.4	Aplikasi Klinis	27
2.6.5	Keamanan dan Toksisitas serta Dosis untuk antiinflamasi ..	28
2.7	Model Tikus.....	30
2.7.1	Karakteristik Tikus Sebagai Model Penuaan	31
2.7.2	Penggunaan Tikus dalam Penelitian Penuaan.....	31
2.7.3	Keunggulan Tikus sebagai Model Penuaan	33
2.7.4	Tikus Sebagai Model Penuaan	33
2.7.5	Keterbatasan Tikus Sebagai Model Penuaan	35
BAB III	KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS	36
3.1	Kerangka Teori.....	36
3.2	Kerangka Konsep	39
3.3	Hipotesis	39
3.4	Validasi	39
BAB IV	METODE PENELITIAN	41
4.1	Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	41
4.2	Populasi dan Sampel Penelitian	42
4.2.1	Populasi	42
4.2.2	Sampel	42
4.3	Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	43
4.3.1	Variabel Bebas	43
4.3.2	Variabel Terikat	43
4.3.3	Definisi Operasional	43
4.4	Bahan dan Instrumen Penelitian.....	44

4.4.1	Bahan Penelitian	44
4.4.2	Instrumen untuk Perlakuan.....	45
4.5	Prosedur Penelitian	45
4.5.1	Perolahan <i>Ethical Clearance</i>	45
4.5.2	Ekstrak Akar Ashwagandha	45
4.5.3	Perlakuan pada Hewan Coba	46
4.6	Tempat dan Waktu Penelitian	46
4.6.1	Tempat Penelitian	46
4.6.2	Waktu Penelitian	47
4.7	Alur Penelitian	48
4.8	Analisis Data	48
BAB V	HASIL DAN PEMBAHASAN	50
5.1	Hasil Penelitian	50
5.1.1	Kadar SOD pada Darah	51
5.1.2	Kadar IL-6 pada Darah	53
5.2	Pembahasan	56
BAB VI	KESIMPULAN DAN SARAN	62
6.1	Kesimpulan	62
6.2	Saran	63
	DAFTAR PUSTAKA	64
	LAMPIRAN	69

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1. Originalitas penelitian	4
Tabel 5.1 Kadar SOD pada Darah	52
Tabel 5.2 Uji Post <i>Hoc Tamhane</i> Kadar SOD	53
Tabel 5.3 Kadar IL-6 pada Darah	54
Tabel 5.4 Uji Post <i>Hoc Tukey</i> Kadar IL-6	55



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2,1	Tanaman Ashwagandha	25
Gambar 3.1.	Kerangka Teori	38
Gambar 3.2	Kerangka Konsep.....	39
Gambar 4.1.	Rancangan penelitian.....	41
Gambar 4.2	Alur Penelitian	48
Gambar 5.1	Kadar SOD pada Darah.....	53
Gambar 5.2	Kadar IL-6 pada Darah.....	56



DAFTAR SINGKATAN

4-HNE	: 4-hydroxynonenal
8-OHdG	: 8-hydroxydeoxyguanosine
ATP	: adenosin trifosfat
BPS	: Badan Pusat Statistik
CAT	: <i>catalase</i>
COA	: <i>Certificate of Analysis</i>
COX-2	: <i>cyclooxygenase-2</i>
CR	: <i>caloric restriction</i>
CRISPR-Cas9	: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Associated Protein 9
CRP	: <i>C-reactive protein</i>
DAMPs	: <i>damage-associated molecular patterns</i>
DNA	: <i>deoxyribonucleic acid</i>
ELISA	: <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
GPx	: <i>glutathione peroxidase</i>
LDL	: <i>low-density lipoprotein</i>
LPS	: <i>lipopolisakarida</i>
LSD	: <i>Least Significant Differences</i>
IL-1 β	: <i>interleukin-1β</i>
IL-6	: <i>interleukin-6</i>
LOX	: <i>lypooxygenase</i>
MDA	: <i>malondialdehyde</i>
mtDNA	: <i>DNA mitokondria</i>
MSDS	: <i>Material Safety Data Sheet</i>
NF- κ B	: <i>nuclear factor-kappa B</i>
NLRP3	: <i>nucleotide-binding and oligomerization domain-like receptor family pyrin domain-containing 3</i>
RNA	: <i>ribonucleic acid</i>
ROS	: <i>reactive oxygen species</i>
SARS-CoV-2	: <i>SARS-associated coronavirus</i>
SOD	: <i>superoxide dismutase</i>
TNF- α	: <i>tumor necrosis factor-alpha</i>

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Surat Ijin Penelitian	70
Lampiran 2.	Ethical Clearance	71
Lampiran 3.	CoA Ekstrak Ashwagandha	72
Lampiran 4.	MDS Ekstrak Ashwagandha	73
Lampiran 5.	Dokumentasi Penelitian.....	756
Lampiran 6.	Data Perubahan Berat Badan Tikus.....	778
Lampiran 7.	Hasil laboratorium	779
Lampiran 8.	Output SPSS.....	80



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Masyarakat saat ini banyak mengonsumsi pola makan tinggi gula dan lemak. Asupan tinggi gula dan lemak jenuh dapat memicu produksi spesies oksigen reaktif (*reactive oxygen species* / ROS) melalui aktivasi enzim NADPH oksidase dan gangguan fungsi rantai transpor elektron mitokondria, yang pada akhirnya menyebabkan kerusakan lipid, protein, dan DNA serta menurunkan efektivitas enzim antioksidan endogen seperti superoksida dismutase (SOD), katalase, dan glutathione peroksidase. Ketidakseimbangan antara produksi ROS yang meningkat dan kapasitas antioksidan yang menurun inilah yang memicu terjadinya stres oksidatif.¹ Selain itu, pola makan tersebut juga dapat mengaktifkan jalur inflamasi seperti NF- κ B dan *NLRP3 inflammasome*, yang memicu pelepasan berbagai sitokin proinflamasi, termasuk IL-6, TNF- α , dan CRP. Kondisi ini berkontribusi terhadap inflamasi kronis tingkat rendah atau *inflammaging*, yang merupakan bagian dari proses penuaan patologis dan berkaitan dengan berbagai gangguan degeneratif.^{1,2} Ashwagandha (*Withania somnifera*), herbal yang berasal dari India, diketahui memiliki sifat antioksidan dan antiinflamasi yang berpotensi menghambat jalur inflamasi serta meningkatkan sistem pertahanan antioksidan tubuh. Saat ini belum ada studi yang secara spesifik mengevaluasi pengaruh pemberian ashwagandha terhadap kadar IL-6 dan SOD, sehingga diperlukan penelitian

lebih lanjut untuk menguji efek aswagandha terhadap inflamaging. Diharapkan dari penelitian ini akan dapat membantu pengembangan dalam penggunaan ilmu herbal terutama Ashwaganda untuk membantu mencegah penyakit yang muncul akibat proses inflamaging.^{3,4}

Berdasarkan data BPS 2020, jumlah penduduk Indonesia berusia 60 tahun ke atas mencapai 25,5 juta orang (9,8% dari total populasi), dengan lebih dari 3,5 juta lansia di Jawa Tengah (10,7% dari total populasi provinsi) dan sekitar 300 ribu lansia di Kota Semarang (12,5% dari total populasi kota). Tubuh manusia memiliki mekanisme pertahanan terhadap stres oksidatif melalui enzim antioksidan seperti *superoxide dismutase* (SOD), *catalase* (CAT), dan *glutathione peroxidase* (GPx). SOD berfungsi sebagai garis pertahanan pertama dengan mengubah radikal superoksida menjadi oksigen dan hidrogen peroksida, namun aktivitasnya menurun seiring bertambahnya usia, meningkatkan kerentanan terhadap kerusakan oksidatif.^{4,5}

Pendekatan berbasis bahan alami semakin banyak diterima sebagai alternatif atau pelengkap terapi konvensional. Ashwagandha yang sering digunakan di Indonesia dikenal sebagai herbal yang memiliki sifat stress adaptogen berbagai manfaat kesehatan, terutama dalam meningkatkan kualitas hidup. Ekstrak akar ashwagandha mengandung senyawa bioaktif seperti withanolides, alkaloid, dan flavonoid, yang memiliki aktivitas farmakologis, termasuk antioksidan, anti-inflamasi, imunomodulator, dan neuroprotektif.⁶ Penelitian menunjukkan bahwa senyawa-senyawa ini mampu menekan produksi ROS dan meningkatkan aktivitas enzim antioksidan, seperti SOD,

CAT, dan GPx. *Withanolides* dan saponin dapat meningkatkan aktivitas SOD, yang berfungsi mengurangi kerusakan sel akibat oksidasi, sementara alkaloid dalam ashwagandha, seperti withanine, memiliki efek stress adaptogenik yang membantu tubuh beradaptasi dengan stres fisik dan mental.⁷

Senyawa-senyawa aktif dalam ashwagandha diketahui dapat menghambat jalur sinyal inflamasi, seperti jalur *Nuclear Factor-Kappa B* (NF- κ B) yang bertanggung jawab atas produksi mediator proinflamasi, termasuk IL-6. Senyawa tersebut membantu menurunkan kadar IL-6 yang berkontribusi pada pengurangan peradangan dan pengelolaan kondisi inflamasi kronis. Ashwagandha menunjukkan potensi besar dalam terapi berbasis bahan alami untuk mendukung kesehatan dan kualitas hidup.⁸⁻¹⁰

Saat ini, belum ada penelitian yang secara spesifik meneliti efek ashwagandha terhadap inflamasi, khususnya pada pengaruhnya terhadap kadar IL-6 dan SOD. Meskipun ashwagandha dikenal memiliki sifat antioksidan dan antiinflamasi, belum ada studi yang membuktikan secara langsung pengaruhnya terhadap biomarker stres oksidatif dan inflamasi terutama dengan metode induksi D- Galactose dan diet tinggi lemak.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah ada pengaruh ekstrak akar ashwagandha terhadap kadar SOD dan IL-6 pada tikus yang diinduksi D-Galaktose dan diet tinggi lemak.

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh pemberian ekstrak akar ashwagandha terhadap kadar SOD dan IL-6 pada tikus yang diinduksi D-Galaktose dan diet tinggi lemak.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Membuktikan pengaruh ekstrak akar ashwagandha terhadap kadar SOD pada tikus yang diinduksi D-Galaktose dan diet tinggi lemak.
2. Membuktikan pengaruh ekstrak akar ashwagandha terhadap kadar IL-6 pada tikus yang diinduksi D-Galaktose dan diet tinggi lemak.
3. Menganalisis perbedaan antara kelompok untuk mengetahui perbedaan kadar SOD dan IL-6 pada tikus yang diinduksi D galaktose dan diet tinggi lemak

1.4 Originalitas Penelitian

Tabel 1.1. Originalitas penelitian

No.	Peneliti	Judul Penelitian	Metode Penelitian	Hasil Penelitian
1.	Baghalpour, et al 2023 ¹¹	Antinociceptive, anti-inflammatory, and antiosidant studies on <i>Withania somnifera</i> (L.) Dunal	Pengujian ekstraksi daun ashwaganda, identifikasi senyawa, serta pengujian aktivitas biologis melalui model hewan tikus winstar (in vivo) dengan dosis 100 dan 300mg/kgbb	<i>W. somnifera</i> dapat digunakan untuk sebagai antinyeri, anti radang dan antioksidan
2.	Gupta, et al 2020 ¹²	Ashwagandha Diminishes Hippocampal Apoptosis Induced by Microwave Radiation by Acetylcholinesterase Dependent Neuro-Inflammatory Pathway in Male <i>Coturnix</i>	32 burung puyuh Jepang jantan yang dibagi menjadi empat kelompok untuk menguji efek paparan radiasi gelombang mikro dan suplementasi ashwagandha, dengan pengukuran histologis	Ashwagandha dapat memulihkan keseimbangan enzimatik dan mengurangi stres oksidatif yang diinduksi oleh paparan gelombang mikro pada hewan coba.

		coturnix Japonica	dan analisis statistik menggunakan ANOVA.	
3.	Suganya K et al 2020 ¹³	Regulation of pro and anti-inflammatory signaling molecules in effect of Withania Somnifera root extract treated sleep deprivation induced Wistar rats.	Studi penelitian invivo pada tikus winstar dengan model deprivasi tidur yang diberikan Ashwagandha sebesar 400mg/kgbb	Withania somnifera dapat membantu mengatur proses inflamasi dengan menurunkan ekspresi pro inflamator (IL-1 β , IL-6, MCP-1 and TNF- α) dan meningkatkan ekspresi anti inflamator (IL10) yang disebabkan oleh deprivasi tidur
4.	Dutta, et al 2018 ¹⁴	Protective effects of Withania somnifera extract in SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis	Penggunaan model tikus SOD1G93A untuk menguji efek ekstrak Withania somnifera	Withania somnifera memiliki kemampuan untuk mengurangi stres oksidatif dan menunjukkan efek anti-inflamasi.
5.	Gupta et al 2013 ¹⁵	Evaluation of anti-inflammatory effect of Withania somnifera root on collagen-induced arthritis in rats.	Studi invivo pada tikus winstar yang diberikan kolagen tipe II untuk menginduksi terjadinya artritis dan diberikan ashwagandha dengan dosis 600 dan 800mg/kgbb	Withania somnifera (Ashwagandha) memiliki efek anti inflamasi pada tikus dengan model model artritis

Berdasarkan tabel tersebut, semua penelitian mengevaluasi kemampuan Ashwagandha untuk meningkatkan aktivitas antioksidan dan mengurangi marker inflamasi, menunjukkan konsistensi. Studi tersebut melibatkan model hewan, yang diinduksi dengan kondisi seperti stres oksidatif, inflamasi kronis, atau penuaan, menunjukkan pendekatan standar untuk menguji hipotesis. Semua penelitian menunjukkan hasil positif, yaitu peningkatan signifikan pada aktivitas antioksidan dan supresi inflamasi setelah pemberian ekstrak akar Ashwagandha. Ini mendukung hipotesis bahwa Ashwagandha memiliki potensi sebagai agen antioksidan dan antiinflamasi.

Pada penelitian ini, secara spesifik mengkaji pengaruh ekstrak akar Ashwagandha terhadap kadar SOD dan kadar IL-6 pada model tikus yang

diinduksi D-galaktosa dan diet tinggi lemak, yang merupakan model stres oksidatif yang terkait dengan penuaan. Penelitian ini berfokus pada SOD dan IL-6 secara bersamaan sebagai indikator spesifik untuk menilai efek antioksidan dan antiinflamasi ekstrak akar Ashwagandha yang kemudian diharapkan dapat memberikan kontribusi orisinal yang relevan untuk memperkuat literatur tentang efek Ashwagandha, terutama dalam konteks penuaan dan degenerasi jaringan. Originalitas tambahan dari penelitian ini terletak pada penggunaan kombinasi diet tinggi lemak dan gula, yang secara sinergis terbukti mempercepat pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS) dan mengaktifasi jalur inflamasi seperti NF- κ B dan NLRP3 inflammasome. Pendekatan ini mencerminkan kondisi nutrisi modern yang berkontribusi terhadap penuaan dini dan inflamasi kronis rendah (*inflammaging*), namun belum dieksplorasi secara spesifik dalam studi Ashwagandha sebelumnya, khususnya di Indonesia. Sampai saat ini, penelitian terkait pengaruh ekstrak akar Ashwagandha (*Withania somnifera*) terhadap kadar Superoksida Dismutase (SOD) dan Interleukin-6 (IL-6) belum banyak dilakukan secara spesifik di Indonesia, sementara di negara lain, penelitian serupa telah menunjukkan hasil yang menjanjikan. Oleh karena itu, penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi orisinal yang relevan dan memberikan wawasan baru mengenai aplikasi ekstrak Ashwagandha dalam konteks kesehatan di Indonesia, dengan mempertimbangkan perbedaan faktor lingkungan, pola makan, dan kondisi genetik yang ada di sini.

1.5 Manfaat Penelitian

1.5.1 Manfaat Teoritis

Memberikan bukti ilmiah mengenai potensi antioksidan dan anti-inflamasi ekstrak akar ashwagandha sebagai agen terapeutik untuk mencegah dampak negatif penuaan.

1.5.2 Manfaat Praktis

Menjadi dasar pengembangan produk herbal berbasis ashwagandha untuk meningkatkan kualitas hidup pada individu lanjut usia.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Super Oksida Dismutase (SOD)

Superoksida Dismutase (SOD) merupakan kelompok enzim metaloenzim yang memiliki peran krusial dalam sistem pertahanan antioksidan endogen pada hampir semua organisme hidup yang terpapar oksigen. Enzim ini mengkatalisis dismutasi atau partisi anion superoksida (O_2^-) menjadi oksigen molekuler (O_2) dan hidrogen peroksida (H_2O_2). Reaksi ini merupakan langkah awal dan sangat penting dalam menetralkan spesies oksigen reaktif (ROS) yang berpotensi merusak sel. Keberadaan SOD menjadi vital untuk melindungi makromolekul biologis seperti DNA, protein, dan lipid dari kerusakan oksidatif yang dapat memicu berbagai kondisi patologis.¹⁶

2.1.1. Biomolekular

SOD secara molekular diklasifikasikan berdasarkan kofaktor logam yang terdapat pada sisi aktifnya. Terdapat tiga isoform utama SOD yang dikenal pada mamalia. SOD1 atau Cu/Zn-SOD, predominantly ditemukan di sitosol, ruang intermembran mitokondria, dan nukleus, menggunakan tembaga (Cu) dan seng (Zn) sebagai kofaktor. SOD2 atau Mn-SOD, berlokasi utama di matriks mitokondria dan menggunakan mangan (Mn) sebagai kofaktor. SOD3 atau EC-SOD (Extracellular SOD), juga merupakan Cu/Zn-SOD, namun diekskresikan ke ruang ekstraseluler dan berikatan dengan matriks

ekstraseluler serta permukaan sel. Struktur kuarterner dari isoform-isoform ini bervariasi, dimana SOD1 umumnya berupa homodimer, SOD2 berupa homotetramer, dan SOD3 juga berupa homotetramer glikosilasi yang memiliki afinitas terhadap heparin sulfat. Variasi genetik pada gen penyandi SOD telah diidentifikasi dan beberapa di antaranya dikaitkan dengan kerentanan terhadap penyakit tertentu.¹⁷

2.1.2. Fungsi

Fungsi utama SOD adalah sebagai garis pertahanan pertama terhadap stres oksidatif dengan mengkatalisis konversi superoksida menjadi hidrogen peroksida dan oksigen. Meskipun hidrogen peroksida juga merupakan ROS, senyawa ini relatif kurang reaktif dibandingkan superoksida dan selanjutnya dapat dieliminasi oleh enzim antioksidan lain seperti katalase dan glutathion peroksidase menjadi air dan oksigen. SOD memainkan peran sentral dalam menjaga keseimbangan redoks seluler dan mencegah akumulasi superoksida yang dapat menginisiasi rantai reaksi radikal bebas yang merusak. Aktivitas SOD yang optimal sangat penting untuk fungsi seluler normal dan homeostasis jaringan.¹⁸

2.1.3. Peran

Peran SOD sangat luas dan beragam dalam sistem biologis. SOD juga terlibat dalam berbagai proses seluler lainnya selain sebagai antioksidan. Misalnya, SOD2 di mitokondria sangat krusial untuk menjaga integritas dan fungsi organel ini, yang merupakan pusat produksi energi seluler dan juga sumber utama ROS endogen. SOD

juga dilaporkan berperan dalam modulasi jalur pensinyalan seluler yang sensitif terhadap redoks, mempengaruhi proses seperti proliferasi sel, apoptosis, dan respons inflamasi. Kemampuannya dalam mengontrol kadar superoksida juga menjadikannya penting dalam proses seperti penuaan, respons imun, dan perkembangan jaringan.¹⁶

2.1.4. Hubungan SOD dengan berbagai Penyakit

Hubungan SOD dalam berbagai penyakit telah menjadi fokus penelitian yang intensif. Disregulasi aktivitas atau ekspresi SOD telah diimplikasikan dalam patogenesis berbagai penyakit. Penurunan aktivitas SOD atau peningkatan produksi superoksida yang melebihi kapasitas SOD dapat menyebabkan stres oksidatif, yang berkontribusi terhadap perkembangan penyakit neurodegeneratif (seperti penyakit Alzheimer, penyakit Parkinson, dan Sklerosis Lateral Amiotrofik), penyakit kardiovaskular (aterosklerosis, hipertensi, iskemia-reperfusi), diabetes melitus dan komplikasinya, penyakit inflamasi kronis (seperti artritis reumatoid), serta kanker. Mutasi pada gen SOD1 secara spesifik terkait dengan beberapa kasus familial Sklerosis Lateral Amiotrofik (ALS). Peningkatan ekspresi SOD dalam beberapa konteks telah menunjukkan efek protektif. Modulasi aktivitas SOD menjadi target terapi potensial untuk berbagai kondisi patologis yang dimediasi oleh stres oksidatif.¹⁷

2.2 Interleukin-6 (IL-6)

Interleukin-6 (IL-6) merupakan sitokin pleiotropik dengan spektrum fungsi biologis yang luas dan beragam. Awalnya diidentifikasi sebagai faktor

diferensiasi sel B (BSF-2), interferon- β 2, dan faktor stimulator hibridoma/plasmasitoma, IL-6 kini diakui sebagai mediator kunci dalam respons imun, inflamasi akut dan kronis, hematopoiesis, serta berbagai proses fisiologis dan patologis lainnya. Produksi IL-6 dapat diinduksi oleh berbagai stimulus, termasuk produk mikroba (seperti lipopolisakarida), sitokin proinflamasi lain (misalnya, IL-1 β dan TNF- α), serta kerusakan jaringan. Regulasi ekspresi dan aktivitasnya yang ketat sangat esensial untuk homeostasis tubuh.¹⁹

2.2.1 Biomolekular

IL-6 secara molekular pada manusia adalah glikoprotein yang terdiri dari 184 asam amino dengan berat molekul sekitar 21-28 kDa, tergantung pada tingkat glikosilasi. Gen penyandi IL-6 terletak pada kromosom 7p21. IL-6 memberikan sinyal melalui kompleks reseptor yang terdiri dari dua subunit: subunit pengikat ligan spesifik, yaitu reseptor IL-6 (IL-6R atau CD126), dan subunit transduksi sinyal umum, yaitu glikoprotein 130 (gp130 atau CD130). Terdapat dua mode utama pensinyalan IL-6: pensinyalan klasik, yang terjadi ketika IL-6 berikatan dengan IL-6R membran (mIL-6R) pada sel-sel tertentu (misalnya, hepatosit, beberapa leukosit), dan pensinyalan trans, di mana IL-6 berikatan dengan bentuk larut dari IL-6R (sIL-6R) dan kompleks ini kemudian dapat mengaktifkan sel yang hanya mengekspresikan gp130. Pensinyalan trans ini secara signifikan memperluas spektrum sel target IL-6 dan sering dikaitkan dengan efek proinflamasi kronis. Aktivasi

kompleks reseptor IL-6/IL-6R/gp130 memicu jalur pensinyalan intraseluler utama, terutama jalur JAK/STAT (Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription), serta jalur MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) dan PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase).¹⁹

2.2.2 Fungsi

Fungsi IL-6 sangat beragam dan bergantung pada konteks seluler serta lingkungan mikro. Dalam respons fase akut, IL-6 merupakan inducer utama sintesis protein fase akut di hepar, seperti C-reactive protein (CRP), serum amiloid A (SAA), dan fibrinogen. IL-6 juga memainkan peran penting dalam diferensiasi sel B menjadi sel plasma penghasil antibodi, serta modulasi respons sel T, termasuk promosi diferensiasi sel T helper 17 (Th17) dan inhibisi sel T regulator (Treg). Lebih lanjut, IL-6 terlibat dalam hematopoiesis, khususnya megakariopoiesis (produksi trombosit), dan menunjukkan aktivitas neurotropik serta berperan dalam regenerasi jaringan dan metabolisme.²⁰

2.2.3 Peran

Peran IL-6 dalam sistem biologis dapat bersifat protektif maupun patogenik. Dalam kondisi akut, seperti infeksi atau cedera, IL-6 berperan penting dalam mengoordinasikan respons imun dan inflamasi untuk eliminasi patogen dan perbaikan jaringan. Namun, produksi IL-6 yang berlebihan atau kronis dapat berkontribusi

signifikan terhadap patogenesis berbagai penyakit. Kemampuan IL-6 untuk mempromosikan inflamasi, proliferasi sel, angiogenesis, dan menghambat apoptosis menjadikannya pemain sentral dalam kondisi inflamasi kronis dan keganasan. Oleh karena itu, keseimbangan aktivitas IL-6 sangat krusial untuk menjaga kesehatan.²¹

2.2.4 Hubungan IL-6 dalam berbagai Penyakit

Hubungan IL-6 dalam berbagai penyakit sangat ekstensif dan telah didokumentasikan dengan baik. Peningkatan kadar IL-6 secara persisten ditemukan pada berbagai penyakit autoimun, seperti artritis reumatoid, lupus eritematosus sistemik, dan penyakit inflamasi usus, di mana IL-6 berkontribusi pada kerusakan jaringan dan inflamasi kronis. Dalam konteks penyakit kardiovaskular, IL-6 dikaitkan dengan perkembangan aterosklerosis dan peningkatan risiko kejadian kardiovaskular. Pada berbagai jenis kanker, IL-6 berperan sebagai faktor pertumbuhan tumor, mempromosikan angiogenesis, metastasis, dan resistensi terhadap terapi. Selain itu, "badai sitokin" yang ditandai dengan kadar IL-6 yang sangat tinggi merupakan komplikasi serius pada beberapa penyakit infeksius, termasuk sepsis dan infeksi virus berat seperti COVID-19, yang berkorelasi dengan keparahan penyakit dan mortalitas. Akibatnya, penghambatan jalur pensinyalan IL-6, misalnya menggunakan antibodi monoklonal terhadap IL-6R (seperti tocilizumab) atau IL-6 itu sendiri, telah menjadi strategi terapi yang efektif atau sedang diselidiki untuk sejumlah kondisi tersebut.²¹

2.3 Penuaan

2.3.1 Definisi

Penuaan merupakan proses biologis alami yang dialami oleh semua makhluk hidup, ditandai dengan perubahan struktural, fungsional, dan biokimiawi yang terjadi secara progresif.¹ Proses ini tidak hanya memengaruhi fisik, tetapi juga mencakup aspek psikologis dan sosial individu. Dalam konteks biologis, penuaan melibatkan kerusakan kumulatif pada sel dan jaringan tubuh yang memengaruhi fungsi dan daya tahan hidup.¹⁶

2.3.2 Teori dan Mekanisme Penuaan

Berikut ini adalah penjelasan beberapa teori utama yang menjelaskan proses penuaan:

1. Teori Genetika

Teori ini berfokus pada peran genetik dalam menentukan umur panjang dan kecepatan penuaan. Gen tertentu, seperti gen terkait sistem perbaikan DNA dan antioksidan, memengaruhi kemampuan sel untuk mempertahankan homeostasis dan bertahan terhadap stres. Pemendekan telomer adalah salah satu mekanisme utama yang menghubungkan genetik dengan penuaan. Telomer adalah struktur pelindung di ujung kromosom yang memendek setiap kali sel membelah. Ketika telomer mencapai panjang kritis tertentu, sel memasuki fase penuaan (senescence) atau apoptosis.¹⁷

2. Teori Stres Oksidatif

Dikenal sebagai *Free Radical Theory of Aging*, teori ini menyatakan bahwa ROS yang dihasilkan selama metabolisme dapat merusak biomolekul penting seperti DNA, protein, dan lipid, yang akhirnya mempercepat proses penuaan.¹

Akumulasi kerusakan oksidatif pada mitokondria berkontribusi pada disfungsi seluler. Kerusakan ini menciptakan lingkaran setan di mana mitokondria yang rusak menghasilkan lebih banyak ROS, mempercepat penuaan.¹⁸

3. Teori Inflamasi (*Inflammaging*)

Teori ini menjelaskan bahwa penuaan disertai oleh peradangan tingkat rendah kronis, yang disebut *inflammaging*. Peningkatan mediator pro-inflamasi, seperti IL-6, TNF- α , dan CRP, berkontribusi pada perkembangan penyakit terkait usia, seperti aterosklerosis, diabetes tipe 2, dan demensia.

Aktivasi kronis dari *NLRP3 inflammasome* di dalam makrofag atau sel imun lainnya meningkatkan produksi sitokin inflamasi, yang merusak jaringan dan organ. *Inflammaging* juga mempercepat disfungsi sistem imun, yang dikenal sebagai *immunosenescence*.²

4. Teori Epigenetik

Epigenetik mencakup perubahan ekspresi gen tanpa perubahan dalam urutan DNA. Modifikasi seperti metilasi DNA,

perubahan histon, dan ekspresi mikroRNA berperan penting dalam penuaan.

Pola metilasi DNA berubah seiring bertambahnya usia, mengakibatkan deregulasi gen yang berkontribusi pada penuaan. *Epigenetic clock* (misalnya, Horvath clock) digunakan untuk memprediksi usia biologis berdasarkan pola metilasi DNA.¹⁹

2.3.2 Diet Tinggi Lemak dan Penuaan

Diet tinggi lemak, terutama yang mengandung lemak jenuh dan trans, dapat berkontribusi pada proses penuaan yang lebih cepat. Konsumsi lemak jenuh secara berlebihan dapat meningkatkan risiko peradangan kronis, kerusakan sel, dan stres oksidatif, yang semuanya berperan dalam mempercepat penuaan. Selain itu, pola makan tinggi lemak juga dapat memengaruhi kesehatan kulit, meningkatkan risiko penyakit jantung, dan merusak fungsi organ tubuh lainnya, yang dapat memperburuk tanda-tanda penuaan. Sebaliknya, diet yang seimbang dengan lemak sehat, seperti yang ditemukan pada alpukat, ikan berlemak, dan kacang-kacangan, dapat membantu memperlambat proses penuaan dan mendukung kesehatan secara keseluruhan.¹⁸

2.3.3 Induksi D-Galaktose dan Inflammaging

Induksi D-galaktosa merupakan salah satu model eksperimental yang banyak digunakan untuk mempelajari proses penuaan buatan (accelerated aging) pada hewan. Secara patofisiologis, pemberian D-

galaktosa dalam dosis tinggi menyebabkan akumulasi metabolit galaktosa seperti galaktitol dan galaktonat, yang tidak dapat dimetabolisme secara efisien. Akumulasi ini memicu stres oksidatif melalui peningkatan produksi radikal bebas dan penurunan aktivitas enzim antioksidan seperti superoksida dismutase (SOD) dan glutathione peroksidase. D-galaktosa mengaktifkan jalur peradangan dengan meningkatkan ekspresi sitokin proinflamasi seperti IL-1 β , IL-6, dan TNF- α , serta menginduksi kerusakan DNA, protein, dan lipid melalui mekanisme peroksidasi lipid. Aktivasi jalur-jalur tersebut berujung pada kerusakan sel, disfungsi mitokondria, dan kematian sel, yang secara keseluruhan meniru berbagai perubahan biologis yang terjadi pada penuaan alami, termasuk penurunan fungsi organ, atrofi jaringan, dan penurunan kognitif. Oleh karena itu, model D-galaktosa memberikan pendekatan yang relevan untuk mengeksplorasi patogenesis penuaan dan mengevaluasi efektivitas intervensi anti-aging.¹⁹

2.4 Stres Oksidatif dan Penuaan

2.4.1 Definisi Stres Oksidatif

Stres oksidatif terjadi ketika terdapat ketidakseimbangan antara produksi ROS dan kemampuan sistem pertahanan antioksidan tubuh untuk menetralkan ROS. Ketidakseimbangan ini menyebabkan kerusakan oksidatif pada komponen seluler seperti DNA, protein, dan

lipid, yang berkontribusi pada perkembangan berbagai penyakit dan penuaan.^{1,20}

2.4.2 Hubungan Antara Stres Oksidatif dan Penuaan

Teori radikal bebas yang diperkenalkan oleh Harman (1956) menyatakan bahwa penuaan adalah hasil akumulasi kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh ROS. Dalam proses metabolisme, mitokondria menghasilkan ROS sebagai produk sampingan. Akumulasi ROS yang tidak terkontrol memengaruhi fungsi seluler dan jaringan, sehingga mempercepat proses penuaan.

Penelitian modern juga menunjukkan bahwa stres oksidatif memengaruhi pemendekan telomer, penurunan fungsi mitokondria, dan peningkatan inflamasi sistemik, yang semuanya merupakan tanda utama penuaan.⁴

2.4.3 Kerusakan Oksidatif pada Molekul Biomolekuler

Stres oksidatif dapat merusak biomolekul penting dalam tubuh, antara lain:

1. DNA: ROS menyebabkan mutasi genetik dan kerusakan DNA, seperti pembentukan aduk oksidatif 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG), yang menghambat replikasi DNA dan mempercepat apoptosis sel.¹⁸
2. Protein: ROS memicu oksidasi protein, mengubah struktur dan fungsi protein, sehingga berkontribusi pada penyakit degeneratif seperti Alzheimer dan Parkinson.²¹

3. Lipid: Lipid peroksidasi oleh ROS menghasilkan produk toksik seperti malondialdehyde (MDA) dan 4-hydroxynonenal (4-HNE), yang merusak membran sel dan organel.²⁰

2.4.4 Mekanisme Antioksidan dalam Melawan Stres Oksidatif

Tubuh memiliki sistem pertahanan antioksidan untuk melawan efek ROS, yang meliputi:

1. Antioksidan Enzimatik: Enzim seperti SOD, CAT, dan GPx bertugas menetralkan ROS.
2. Antioksidan Non-Enzimatik: Molekul seperti vitamin C, vitamin E, glutathione, dan polifenol membantu mengurangi kerusakan oksidatif.²⁰

Kemampuan sistem antioksidan ini menurun seiring bertambahnya usia, yang meningkatkan kerentanan terhadap stres oksidatif dan mempercepat penuaan.²²

2.4.5 Implikasi Klinis Stres Oksidatif dalam Penuaan

Kerusakan oksidatif yang diakibatkan oleh stres oksidatif memiliki peran penting dalam berbagai penyakit degeneratif yang berkaitan dengan penuaan, seperti:⁵

1. Penyakit Kardiovaskular: Stres oksidatif memicu aterosklerosis melalui oksidasi LDL.
2. Diabetes: ROS berkontribusi pada komplikasi diabetes melalui kerusakan pembuluh darah dan jaringan saraf.
3. Neurodegenerasi: Stres oksidatif dikaitkan dengan kerusakan neuron pada penyakit Alzheimer dan Parkinson.

2.4.6 Strategi Mengurangi Stres Oksidatif

Upaya untuk mengurangi dampak stres oksidatif dalam penuaan meliputi:

1. Intervensi Nutrisi: Mengonsumsi makanan kaya antioksidan seperti buah, sayuran, dan teh hijau.⁶
2. Olahraga Teratur: Latihan fisik intensitas sedang dapat meningkatkan kapasitas antioksidan tubuh.⁶
3. Terapi Antioksidan: Penggunaan suplemen seperti vitamin C, vitamin E, dan senyawa polifenol untuk mengurangi ROS.²⁰

2.5 Inflamasi pada Penuaan (*Inflammaging*)

2.5.1 Definisi

Istilah *inflammaging* pertama kali diperkenalkan untuk menggambarkan keadaan inflamasi kronis tingkat rendah yang berkembang selama penuaan.⁷ Kondisi ini ditandai dengan peningkatan kadar biomolekul inflamasi seperti IL-6, TNF- α , dan CRP. *Inflammaging* merupakan salah satu tanda utama penuaan dan diyakini sebagai faktor kunci dalam perkembangan berbagai penyakit degeneratif terkait usia, seperti aterosklerosis, diabetes, dan Alzheimer.

Inflammaging berkontribusi terhadap perkembangan berbagai penyakit degeneratif terkait usia, seperti:

1. Penyakit Kardiovaskular: Inflamasi kronis mempercepat aterosklerosis melalui aktivasi sel endotel dan pembentukan plak.⁸

2. Diabetes Tipe 2: Sitokin proinflamasi seperti TNF- α mengganggu jalur sinyal insulin, memicu resistensi insulin.⁸
3. Neurodegenerasi: Inflamasi kronis di otak, terutama yang dimediasi oleh aktivasi mikroglia, berkontribusi pada patogenesis Alzheimer dan Parkinson.²²

2.5.2 Mekanisme Dasar *Inflammaging*

Proses *inflammaging* terjadi akibat interaksi berbagai mekanisme biologis, antara lain:

1. Akumulasi Kerusakan Molekuler

Kerusakan molekuler yang diinduksi oleh radikal bebas, glikasi, dan stres oksidatif dapat memicu aktivasi respon inflamasi melalui jalur sinyal seperti NF- κ B. Aktivasi ini memicu produksi sitokin proinflamasi.⁶

2. Disfungsi Mitokondria

Penuaan menyebabkan mitokondria menghasilkan lebih banyak ROS sebagai produk sampingan metabolisme. ROS dapat merusak DNA mitokondria (mtDNA) dan memicu inflamasi melalui pelepasan *damage-associated molecular patterns* (DAMPs), seperti ATP dan protein mitokondria.¹⁷

3. Imunosenesens

Penuaan sistem imun, yang dikenal sebagai *immunosenescence*, menyebabkan perubahan pada komposisi sel imun, seperti penurunan fungsi limfosit T dan peningkatan monosit

proinflamasi. Kondisi ini berkontribusi pada lingkungan inflamasi kronis.¹⁰

4. Peran Mikrobiota Usus

Penuaan memengaruhi komposisi mikrobiota usus, mengurangi keberadaan bakteri menguntungkan seperti *Bifidobacteria*. Perubahan ini dapat meningkatkan permeabilitas usus dan memungkinkan translokasi lipopolisakarida (LPS), yang memicu respon inflamasi sistemik.²³

2.5.3 Biomarker *Inflammaging*

Beberapa biomarker telah diidentifikasi sebagai indikator *inflammaging*, antara lain:¹²

1. Interleukin-6 (IL-6): Peningkatan IL-6 pada lansia didorong oleh aktivasi kronis sistem imun bawaan dan akumulasi sel tua (senescent cells) yang menghasilkan sitokin proinflamasi, termasuk IL-6 sendiri. IL-6 berkontribusi terhadap penuaan melalui aktivasi jalur JAK/STAT3, yang menurunkan regenerasi jaringan, memperburuk sarkopenia, serta mempercepat gangguan vaskular dan neurodegenerasi. IL-6 juga menstimulasi produksi CRP, memperkuat inflamasi sistemik. Peningkatan kadar IL-6 telah terbukti konsisten berkorelasi dengan penurunan fungsi fisiologis, komorbiditas kronis, dan risiko mortalitas. Karena kestabilannya dan peranannya dalam berbagai jalur inflamasi

penuaan, IL-6 dianggap sebagai indikator paling relevan dan representatif dalam penilaian status biologis lansia.

2. *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF- α): Peningkatan kadar TNF- α seiring bertambahnya usia dihasilkan dari aktivasi sel imun seperti makrofag dan sel T akibat akumulasi kerusakan jaringan dan stres oksidatif. TNF- α bekerja melalui aktivasi jalur NF- κ B, yang mendorong ekspresi gen proinflamasi lainnya serta enzim degradasi jaringan. Secara fisiologis, TNF- α menghambat sinyal anabolik seperti insulin/IGF-1, sehingga mengganggu pertumbuhan dan perbaikan sel, serta menyebabkan resistensi insulin, disfungsi endotel, dan kerusakan mitokondria. Konsekuensinya, TNF- α berkontribusi terhadap percepatan penuaan metabolik, penurunan cadangan fungsional jaringan, dan perburukan penyakit degeneratif seperti aterosklerosis, diabetes, dan Alzheimer. Karena perannya yang luas dan mendasar dalam disregulasi homeostasis jaringan, TNF- α menjadi salah satu biomarker penting dalam menilai inflamasi terkait usia.
3. *C-Reactive Protein* (CRP): Pada lansia, kadar CRP meningkat secara kronis meskipun tanpa adanya infeksi akut, mencerminkan keberadaan inflamasi sistemik tingkat rendah yang menetap. Meskipun CRP bukan sitokin, ia berperan memperkuat inflamasi melalui aktivasi sistem komplemen dan opsonisasi, yang dapat memperberat kerusakan jaringan. Secara klinis, kadar CRP yang tinggi pada populasi usia lanjut berhubungan erat dengan frailty,

penurunan status fungsional, gangguan kognitif, serta peningkatan risiko penyakit kardiovaskular dan kematian dini. Karena kestabilannya dalam sirkulasi dan kemudahan pengukurannya, CRP sering digunakan sebagai biomarker surrogate dari inflamming dan memiliki nilai prognostik dalam stratifikasi risiko lansia.

4. Interleukin-1 beta (IL-1 β) : Peningkatan IL-1 β mencerminkan respons inflamasi kronik terhadap kerusakan sel yang tidak terselesaikan. IL-1 β memiliki efek biologis yang luas, termasuk meningkatkan ekspresi IL-6 dan TNF- α , sehingga memperkuat lingkaran umpan balik inflamasi dalam jaringan yang menua. Selain itu, IL-1 β diketahui berkontribusi terhadap neuroinflamasi, penurunan neurogenesis, dan disfungsi sinaps, yang berperan penting dalam patogenesis penurunan kognitif dan demensia pada usia lanjut. Oleh karena itu, IL-1 β dianggap sebagai biomarker awal dari aktivasi inflamasi seluler yang berperan dalam transisi dari penuaan normal menuju penuaan patologis.

2.6 Ashwagandha

Ashwagandha atau ginseng India, adalah tanaman adaptogenik yang telah digunakan selama berabad-abad dalam sistem pengobatan Ayurveda. Tanaman ini terkenal karena kandungan metabolit sekundernya yang memiliki sifat antioksidan dan anti-inflamasi. Berdasarkan hasil dari fitokimia akar Ashwagandha lebih banyak digunakan karena kandungan senyawa aktif

utamanya, yaitu withanolides, memiliki konsentrasi tertinggi dan profil yang paling stabil dibandingkan dengan bagian tanaman lainnya sehingga sampai saat ini masih digunakan sebagai golden standart untuk pengobatan berbasis herbal⁴⁷. Dengan meningkatnya prevalensi penyakit yang berhubungan dengan stres oksidatif dan inflamasi, seperti penyakit degeneratif terkait usia, Ashwagandha menjadi subjek penelitian yang menarik untuk pengembangan agen terapeutik alami.²⁴



Gambar 2.1. Tanaman Ashwagandha⁴⁸

2.6.1 Komponen Bioaktif Ashwagandha

Berbagai senyawa bioaktif dalam ashwagandha berkontribusi pada sifat terapeutiknya.²⁵

1. Withanolida: Steroidal lactones yang memiliki aktivitas antioksidan, anti-inflamasi, dan imunomodulator.
2. Alkaloid: Berperan dalam perlindungan terhadap stres oksidatif dan inflamasi.
3. Flavonoid dan Tannin: Antioksidan alami yang melawan radikal bebas.
4. Saponin: Mendukung aktivitas imunomodulasi.

2.6.2 Aktivitas Antioksidan Ashwagandha

Stres oksidatif terjadi akibat ketidakseimbangan antara produksi ROS dan kemampuan tubuh untuk menetralkannya. Ashwagandha menunjukkan aktivitas antioksidan melalui mekanisme berikut:

1. Eliminasi ROS

Ekstrak akar ashwagandha memiliki kapasitas untuk mengurangi ROS seperti superoksida dan hidrogen peroksida, sehingga melindungi biomolekul dari kerusakan oksidatif.²⁶

2. Stimulasi Enzim Antioksidan

Tanaman ini meningkatkan ekspresi enzim antioksidan seperti SOD, CAT, dan GPx. Hal ini membantu menjaga integritas seluler dengan mencegah peroksidasi lipid dan oksidasi protein.²⁷

3. Perlindungan DNA

Studi menunjukkan bahwa ashwagandha melindungi DNA dari kerusakan oksidatif, terutama terhadap serangan radikal bebas.²⁷

2.6.3 Aktivitas Anti-Inflamasi Ashwagandha

Inflamasi kronis adalah salah satu faktor utama yang memengaruhi perkembangan penyakit degeneratif. Ashwagandha bertindak sebagai agen anti-inflamasi melalui berbagai mekanisme:

1. Inhibisi Jalur NF- κ B

NF- κ B adalah jalur sinyal utama yang memicu ekspresi gen proinflamasi seperti TNF- α , IL-6, dan *cyclooxygenase-2* (COX-2).

Ashwagandha secara signifikan menghambat aktivasi NF- κ B, sehingga menekan respon inflamasi.²⁵

2. Modulasi Sitokin Proinflamasi

Tanaman ini menurunkan kadar sitokin proinflamasi seperti IL-1 β , IL-6, dan TNF- α , yang memainkan peran kunci dalam inflamasi sistemik.⁹

3. Inhibisi COX dan LOX

Ekstrak akar ashwagandha menghambat aktivitas COX dan *lipoxygenase* (LOX), yang merupakan enzim utama dalam jalur inflamasi.²⁸

4. Efek pada Inflamasi Kronis

Ashwagandha telah terbukti efektif dalam model hewan dengan penyakit inflamasi kronis, seperti artritis reumatoid, dengan menekan peradangan pada jaringan sendi.²⁸

2.6.4 Aplikasi Klinis

Penggunaan ashwagandha sebagai agen antioksidan dan anti-inflamasi telah dieksplorasi dalam berbagai penyakit:

1. Penyakit Neurodegeneratif: Tanaman ini menunjukkan potensi dalam mencegah kerusakan neuron akibat stres oksidatif, seperti pada penyakit Alzheimer dan Parkinson.²⁹
2. Penyakit Kardiovaskular: Sifat antioksidan membantu mencegah aterosklerosis dengan mengurangi peroksidasi lipid.²⁷

3. Diabetes: Efek anti-inflamasi dan antioksidan mendukung perlindungan terhadap komplikasi diabetes.²⁹
4. Kanker: Ashwagandha menghambat proliferasi sel kanker melalui efek imunomodulasi dan anti-inflamasi.²⁷

2.6.5 Keamanan dan Toksisitas serta Dosis untuk antiinflamasi

Studi toksikologi menunjukkan bahwa ashwagandha aman digunakan dalam dosis terapeutik. Namun, konsumsi jangka panjang dalam dosis tinggi harus dihindari untuk mencegah efek samping seperti gangguan gastrointestinal.²⁶

Dosis ekstrak akar *Withania somnifera* (Ashwagandha) yang digunakan dalam berbagai penelitian bervariasi tergantung pada tujuan terapeutik, desain studi, serta model hewan atau manusia yang digunakan. Pada umumnya, dosis Ashwagandha yang telah diteliti berkisar antara 50 mg/kgBB hingga 1000 mg/kgBB pada model hewan, dan 250 mg hingga 600 mg per hari pada manusia.²⁷

Beberapa studi *in vivo* pada hewan menggunakan dosis tinggi untuk menstimulasi efek farmakologis secara lebih nyata. Misalnya, Anbalagan & Sadique menggunakan ekstrak air Ashwagandha pada dosis 100 mg/kg dan 200 mg/kgBB untuk menilai efek antiinflamasi pada model edema tikus, dan hasilnya menunjukkan penurunan signifikan aktivitas enzim pro-inflamasi dan leukosit. Dalam penelitian lain, Gupta et al. menggunakan dosis 50, 100, dan 200 mg/kgBB untuk

mengevaluasi efek imunomodulasi dan menunjukkan respons dosis-respons yang baik terhadap parameter inflamasi.²⁸

Sementara itu, penelitian yang dilakukan pada manusia lebih sering menggunakan dosis yang terstandarisasi dan dibatasi pada kisaran 250–600 mg per hari, terutama untuk memastikan keamanan jangka panjang. Misalnya, Chandrasekhar et al. menggunakan dosis 300 mg dua kali sehari (total 600 mg/hari) pada orang dewasa untuk mengkaji efek Ashwagandha terhadap stres dan biomarker inflamasi, yang menunjukkan perbaikan kadar kortisol serta pengurangan keluhan somatik. Studi lain oleh Auddy et al. (2008) juga menggunakan 125 mg, 250 mg, dan 500 mg dua kali sehari, dengan hasil bahwa dosis 250 mg dan 500 mg menunjukkan perbaikan signifikan dalam parameter stres dan peradangan.²⁸

Dalam hal antioksidan dan inflamasi, SOD dan IL-6 tidak selalu dijadikan target utama dalam studi terdahulu, namun banyak penelitian menunjukkan bahwa dosis 100–300 mg/kgBB (hewan) atau 250–600 mg/hari (manusia) efektif untuk menurunkan marker stres oksidatif lain seperti malondialdehyde (MDA) atau meningkatkan aktivitas enzim antioksidan seperti GPx dan catalase.²⁸

Di antara berbagai dosis yang telah diteliti, dosis 300 mg/hari merupakan salah satu yang paling banyak digunakan dalam penelitian klinis maupun preklinis karena dianggap sebagai dosis efektif dan aman,

terutama untuk memperoleh efek antiinflamasi, antistres, dan imunomodulator.²⁸

Salah satu studi yang cukup sering dirujuk adalah oleh yang menggunakan 300 mg ekstrak akar Ashwagandha dua kali sehari (total 600 mg/hari) selama 60 hari pada orang dewasa sehat. Studi ini menunjukkan penurunan signifikan kadar kortisol serum, peningkatan daya tahan tubuh terhadap stres, serta perbaikan pada parameter inflamasi dan kualitas hidup subjek.²⁸

Penelitian oleh Auddy et al. juga menggunakan dosis bertingkat (125 mg, 250 mg, dan 500 mg dua kali sehari) dan menemukan bahwa dosis 250 mg dua kali sehari menghasilkan perbaikan bermakna terhadap skor kelelahan dan biomarker stres. Ini mengindikasikan bahwa dosis 300–500 mg/hari sudah memadai untuk mencapai efek fisiologis tanpa menyebabkan efek samping.²⁸

Dalam model hewan, dosis ekuivalen 300 mg/hari pada manusia telah disesuaikan dan dikonversi ke dosis berdasarkan berat badan tikus (menggunakan rumus konversi interspesies mg/kg), dan menghasilkan efek penurunan mediator inflamasi seperti $\text{TNF-}\alpha$ dan $\text{IL-1}\beta$, serta peningkatan enzim antioksidan, walaupun secara spesifik belum banyak yang menilai SOD dan IL-6 secara bersamaan.²⁸

2.7 Model Tikus

Tikus (*Rattus norvegicus*) merupakan salah satu model hewan yang paling sering digunakan dalam penelitian biomedis, termasuk studi tentang penuaan. Tikus memiliki berbagai keunggulan, seperti kemiripan fisiologis

dengan manusia, siklus hidup yang relatif pendek, dan kemudahan dalam manipulasi genetik serta kontrol lingkungan. Studi menggunakan tikus telah memberikan wawasan penting mengenai mekanisme molekuler, fisiologis, dan biokimiawi dari penuaan serta pengembangan intervensi anti-penuaan.⁸

2.7.1 Karakteristik Tikus Sebagai Model Penuaan

Tikus memiliki beberapa karakteristik yang menjadikannya ideal sebagai model penuaan:⁸

1. Siklus Hidup Cepat: Tikus memiliki umur rata-rata sekitar 2-3 tahun, memungkinkan studi longitudinal penuaan dalam waktu relatif singkat.
2. Kemiripan Genetik: Tikus berbagi sekitar 90% gen dengan manusia, membuat hasil penelitian pada tikus relevan dengan biologi manusia.
3. Respons Fisiologis yang Serupa: Proses penuaan pada tikus melibatkan perubahan yang sama seperti pada manusia, seperti penurunan fungsi kognitif, kerentanan terhadap penyakit, dan akumulasi kerusakan oksidatif.

2.7.2 Penggunaan Tikus dalam Penelitian Penuaan

Studi penuaan pada tikus melibatkan berbagai pendekatan, termasuk pengamatan perubahan biologis selama siklus hidup dan intervensi anti-penuaan.

1. Studi Perubahan Biologis Selama Penuaan

- a. Kerusakan DNA dan Genom: Tikus menunjukkan peningkatan kerusakan DNA dan disfungsi telomer dengan bertambahnya usia.¹⁸
- b. Penurunan Fungsi Imun: Tikus tua mengalami immunosenescence, termasuk penurunan fungsi limfosit T dan peningkatan inflamasi sistemik (*inflammaging*).¹⁰
- c. Stres Oksidatif: Studi menunjukkan bahwa tikus tua memiliki kadar ROS yang lebih tinggi dan kapasitas antioksidan yang menurun dibandingkan tikus muda.⁸

2. Model Penyakit Degeneratif

Tikus sering digunakan untuk mempelajari penyakit yang berkaitan dengan penuaan, seperti:⁷

- a. Penyakit Kardiovaskular: Tikus menunjukkan perubahan tekanan darah, penebalan dinding pembuluh darah, dan peningkatan aterosklerosis dengan bertambahnya usia.
- b. Diabetes Tipe 2: Model tikus penuaan digunakan untuk memahami mekanisme resistensi insulin yang berkembang selama penuaan.
- c. Neurodegenerasi: Tikus digunakan untuk mempelajari patogenesis Alzheimer dan Parkinson, termasuk akumulasi protein beta-amiloid dan disfungsi mitokondria.

3. Studi Intervensi Anti-Penuaan

Tikus adalah subjek utama untuk menguji berbagai intervensi anti-penuaan, seperti:¹⁸

- a. Restriksi Kalori (*Caloric Restriction/CR*): CR pada tikus telah terbukti memperpanjang umur dan meningkatkan kualitas hidup dengan mengurangi stres oksidatif dan inflamasi.
- b. Senolitik: Senyawa yang menargetkan sel tua (*senescent cells*) pada tikus menunjukkan perbaikan fungsi jaringan dan perpanjangan umur.
- c. Antioksidan dan Suplemen: Tikus digunakan untuk menguji efek suplemen seperti vitamin E, resveratrol, dan ashwagandha terhadap penuaan.

2.7.3 Keunggulan Tikus sebagai Model Penuaan

1. Reproduksi Cepat: Tikus berkembang biak dengan cepat, memungkinkan studi multigenerasi.¹⁹
2. Variasi Genetik: Tersedia berbagai strain tikus dengan karakteristik genetik tertentu, seperti tikus *Sprague-Dawley* dan *Wistar*, yang sering digunakan dalam penelitian penuaan.¹¹
3. Manipulasi Genetik: Teknologi seperti *CRISPR-Cas9* memungkinkan modifikasi gen untuk mempelajari gen spesifik yang terlibat dalam penuaan.¹⁸

2.7.4 Tikus Sebagai Model Penuaan

Hubungan antara usia biologis tikus dan manusia telah diteliti secara sistematis, di mana periode 28 hingga 56 hari stimulasi pada

tikus dewasa dapat merefleksikan perubahan fungsional yang setara dengan proses penuaan selama bertahun-tahun pada manusia.³⁰

Salah satu model eksperimental yang paling umum digunakan adalah induksi penuaan dengan D-galaktosa. D-galaktosa (D-gal) dalam dosis tinggi, umumnya 100–150 mg/kg/hari, diberikan secara intraperitoneal atau subkutan selama 4 hingga 10 minggu. D-gal diketahui meningkatkan produksi radikal bebas (ROS), menurunkan aktivitas enzim antioksidan seperti superoksida dismutase (SOD), serta menyebabkan akumulasi produk akhir glikasi (AGEs) yang kemudian mengaktifkan jalur pensinyalan RAGE–NF- κ B.^{5,18} Aktivasi jalur tersebut menyebabkan peningkatan ekspresi sitokin proinflamasi seperti IL-6, TNF- α , dan IL-1 β , sehingga menimbulkan kondisi inflamasi kronik tingkat rendah yang dikenal sebagai *inflammaging* [4]. Secara fenotipik, model ini juga memperlihatkan gangguan kognitif, penurunan fungsi motorik, serta ekspresi marker sel senescent seperti p16 dan β -galaktosidase.¹⁸

Untuk menciptakan model penuaan yang lebih kompleks dan menyerupai kondisi metabolik lansia, beberapa penelitian menggabungkan induksi D-gal dengan pemberian diet tinggi lemak (high-fat diet, HFD). Kombinasi ini secara sinergis mempercepat timbulnya stres oksidatif dan inflamasi sistemik. Diet tinggi lemak sendiri telah terbukti meningkatkan produksi ROS di hati melalui jalur mitokondria dan NADPH oksidase, serta memicu inflamasi

hipotalamus melalui aktivasi reseptor toll-like receptor 4 (TLR4).³¹ Jika dikombinasikan dengan D-gal, maka terjadi peningkatan kerusakan oksidatif, disfungsi metabolik, resistensi insulin, serta gangguan struktur jaringan seperti tulang dan otak.^{31,32} Studi-studi menunjukkan bahwa durasi 28 hari sudah cukup untuk memunculkan biomarker penuaan seperti peningkatan MDA, penurunan SOD, serta ekspresi sitokin proinflamasi yang khas pada proses *inflammaging*.^{5,33}

2.7.5 Keterbatasan Tikus Sebagai Model Penuaan

Meskipun tikus adalah model yang kuat, mereka memiliki beberapa keterbatasan:¹⁸

1. Perbedaan Metabolisme: Metabolisme tikus lebih cepat daripada manusia, yang dapat memengaruhi relevansi beberapa hasil penelitian.
2. Perbedaan Ukuran dan Fisiologi: Tikus berbeda dalam hal ukuran organ, metabolisme, dan beberapa aspek fisiologi lainnya.
3. Kurangnya Representasi Kompleksitas Penuaan pada Manusia: Beberapa aspek penuaan, seperti faktor sosial dan psikologis, sulit dimodelkan pada tikus.

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS

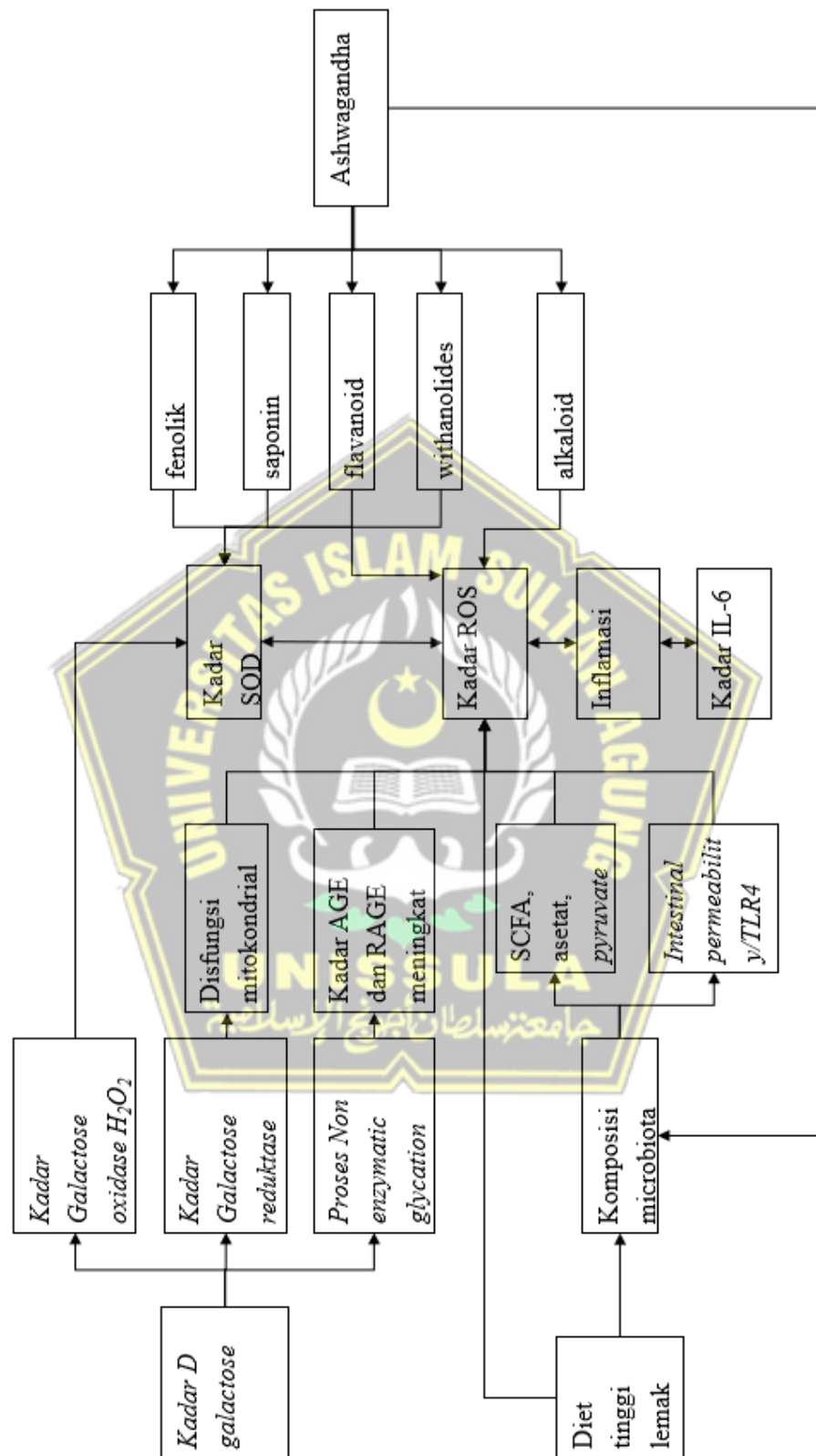
3.1 Kerangka Teori

Penuaan adalah proses biologis yang melibatkan perubahan degeneratif progresif pada sel, jaringan, dan organ yang mengarah pada penurunan fungsi fisiologis.⁵ Mekanisme penuaan melibatkan ketidakseimbangan antara produksi ROS dan kapasitas antioksidan tubuh, menyebabkan kerusakan biomolekuler seperti DNA, protein, dan lipid. Efek pada penuaan berupa: peningkatan ROS menyebabkan kerusakan DNA, lipid, dan protein; dan mempercepat proses apoptosis dan disfungsi mitokondria.³ Inflamasi kronis tingkat rendah yang berkembang seiring bertambahnya usia, ditandai dengan peningkatan sitokin proinflamasi seperti IL-6 dan TNF- α . Mekanismenya adalah melalui aktivasi jalur NF- κ B memicu pelepasan sitokin proinflamasi seperti IL-1 β , IL-6, dan TNF- α ; disfungsi imun (*immunosenescence*) meningkatkan risiko inflamasi sistemik.⁶ Pola makan tinggi lemak terbukti memperburuk stres oksidatif melalui aktivasi enzim NADPH oksidase dan disfungsi mitokondria yang meningkatkan produksi ROS.³² Diet tinggi lemak dapat menyebabkan gangguan mikrobiota usus dan peningkatan permeabilitas saluran cerna, yang memungkinkan translokasi LPS ke sirkulasi sistemik dan mengaktifasi TLR4, memicu inflamasi sistemik melalui jalur NF- κ B.^{31,34}

D-galaktosa dalam jumlah berlebih dapat memicu stres oksidatif melalui tiga jalur metabolik utama, yaitu reduksi oleh galactose reductase, oksidasi oleh galactose oxidase, dan glikasi non-enzimatik. D-galaktosa diubah menjadi galaktitol oleh galactose reductase pada jalur reduksi. Karena galaktitol tidak dapat dimetabolisme lebih lanjut, akumulasinya menyebabkan stres osmotik dan gangguan sistem antioksidan seluler. Galactose oxidase mengubah D-galaktosa menjadi aldehida reaktif dan hidrogen peroksida (H_2O_2) pada jalur oksidasi, yang dapat menurunkan kadar SOD dan selanjutnya akan meningkatkan ROS dan dapat merusak struktur sel.³⁵

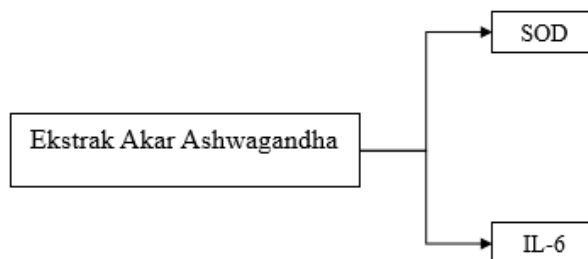
D-galaktosa juga mengalami reaksi glikasi non-enzimatik, membentuk advanced glycation end-products (AGEs). AGEs akan mengikat reseptor RAGE, mengaktifkan NADPH oxidase dan jalur transduksi sinyal inflamasi seperti NF- κ B, yang turut meningkatkan produksi ROS dan sitokin proinflamasi seperti IL-6. Kombinasi ketiga jalur ini memperkuat stres oksidatif dan inflamasi, sehingga mempercepat proses penuaan dan kerusakan jaringan.³⁵

Tanaman ashwagandha mengandung withanolida, alkaloid, flavonoid, dan tannin yang memiliki aktivitas antioksidan dan anti-inflamasi. Aktivitas antioksidan dari tanaman ini yaitu meningkatkan ekspresi enzim antioksidan seperti SOD, CAT, dan GPx serta melindungi DNA dan lipid dari kerusakan oksidatif. Aktivitas antiinflamasinya bekerja dengan cara menghambat jalur NF- κ B dan menurunkan kadar sitokin proinflamasi, mengurangi inflamasi sistemik pada model penyakit kronis.⁹



Gambar 3.1. Kerangka Teori

3.2 Kerangka Konsep



Gambar 3.2 Kerangka Konsep

3.3 Hipotesis

Terdapat pengaruh pemberian ekstrak akar ashwagandha terhadap kadar SOD dan IL-6 pada tikus yang diinduksi D-Galaktose dan diet tinggi lemak.

3.4 Validasi

Pada penelitian ini validasi tidak dilakukan dikarenakan model penelitian dilakukan dengan post-test only control group design. Induksi D-galaktosa dan diet tinggi lemak merupakan salah satu model eksperimental yang banyak digunakan untuk mempelajari proses penuaan buatan (accelerated aging) pada hewan. D-galaktosa mengaktivasi jalur peradangan dengan meningkatkan ekspresi sitokin proinflamasi seperti IL-1 β , IL-6, dan TNF- α , serta menginduksi kerusakan DNA, protein, dan lipid melalui mekanisme peroksidasi lipid. Aktivasi jalur-jalur tersebut berujung pada kerusakan sel, disfungsi mitokondria, dan kematian sel, yang secara keseluruhan meniru berbagai perubahan biologis yang terjadi pada penuaan alami, termasuk penurunan fungsi organ, atrofi jaringan, dan penurunan kognitif. Untuk menciptakan model penuaan yang lebih kompleks dan menyerupai kondisi

metabolik lansia, penelitian ini menggabungkan induksi D-gal dengan pemberian diet tinggi lemak. Kombinasi ini secara sinergis mempercepat timbulnya stres oksidatif dan inflamasi sistemik.



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental dengan pendekatan *true experimental design*. Model yang digunakan adalah *post-test only control group design* untuk mengukur efek perlakuan terhadap parameter biologis penuaan yang menggunakan objek penelitian tikus (*Rattus norvegicus*). Adapun perlakuan terdiri dari :

1. K1 (Kelompok sehat)
2. K2 (Kelompok kontrol negatif yang diinduksi D-Galaktosa dan diet tinggi lemak dengan pemberian Na CMC 01%)
3. K3 (Kelompok perlakuan yang mendapatkan pemberian ekstrak akar aswagandha 150 mg/kgBB/hari yang dilarutkan dalam Na CMC 01%)
4. K4 (Kelompok perlakuan yang mendapat pemberian ekstrak akar aswagandha dengan dosis 300 mg/kgBB/hari Na CMC 01%)



Gambar 4.1. Rancangan penelitian

Keterangan :

O-K1 : Observasi/pengamatan kadar SOD dan IL-6 pada kelompok K1

O-K2 : Observasi/pengkuran kadar SOD dan IL-6 pada kelompok K2

O-K3 : Observasi/pengkuran kadar SOD dan IL-6 pada kelompok K3

O-K4 : Observasi/pengkuran kadar SOD dan IL-6 pada kelompok K4

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Populasi

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus strain wistar jantan dewasa. Adapun kriteria inklusi sampel adalah sebagai berikut :

1. Tikus (*Rattus norvegicus*) Strain Wistar Jantan.
2. Usia 2-3 bulan.
3. Berat badan tikus adalah 200 - 250 gram.
4. Tikus dalam kondisi sehat.

Kriteria drop out sampel adalah sebagai berikut :

1. Tikus sakit saat dilakukan penelitian

4.2.2 Sampel

Penelitian ini menggunakan metode simple random sampling, yaitu teknik pengambilan sampel secara acak di mana setiap tikus dalam populasi memiliki peluang yang sama untuk terpilih menjadi subjek penelitian. Untuk menentukan jumlah minimal sampel yang diperlukan, digunakan Rumus Federer, yakni $(n - 1)(t - 1) \geq 15$, di mana t adalah jumlah kelompok perlakuan dan n adalah jumlah hewan uji per kelompok. Dalam penelitian ini terdapat 4 kelompok perlakuan ($t = 4$), sehingga berdasarkan perhitungan diperoleh bahwa minimal jumlah sampel per kelompok adalah lebih atau sama dengan 6. Dengan demikian, total tikus yang digunakan adalah 24 ekor. Tikus yang digunakan merupakan tikus jantan galur Wistar, karena galur ini lazim digunakan dalam penelitian biomedis dan memiliki karakteristik fisiologis yang seragam serta respons imun yang stabil. Pemilihan tikus

jantan juga dimaksudkan untuk meminimalkan variabilitas hormonal yang dapat memengaruhi hasil penelitian. Setelah jumlah dan jenis hewan ditentukan, tikus dibagi secara acak ke dalam 4 kelompok menggunakan teknik randomized sampling sehingga masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor tikus dan menerima perlakuan yang berbeda sesuai desain eksperimen. Pada penelitian ini akan digunakan 28 ekor tikus dengan masing-masing kelompok akan memiliki 1 cadangan tikus.

4.3 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak akar ashwagandha 150 dan 300 mgKgBB/hari

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar SOD dan kadar IL-6.

4.3.3 Definisi Operasional

1. Ekstrak akar ashwagandha yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari PT Mensa Binasukses, Pulogadung. Dosis ekstrak akar Ashwagandha yang digunakan 150mg/kgBB/hari dan 300mg/kgBB/hari. Ekstrak akar ashwagandha diberikan secara oral dengan menggunakan sonde dengan diencerkan dalam larutan Carboxymethylcellulose 0.1% selama 28 hari.

2. D-galaktose yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari PT Mensa Binasukses, Pulogadung. D-galaktose diberikan secara oral dengan menggunakan sonde dengan diencerkan dalam larutan aquabides.
3. Kadar SOD pada penelitian ini ditetapkan dari darah sampel vena orbita tikus. Penetapan kadar SOD untuk mengetahui kapasitas antioksidan akan diperiksa dengan metode ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*). Reagen, standar dan sampel disiapkan kemudian masing-masing dimasukkan ke dalam *well* dan diinkubasi. Penambahan *biotin-labeled antibody* dan macam *solution* kemudian dibaca pada alat *microplate* ELISA. Satuan hasil menggunakan pg/mL dengan skala rasio.
4. Kadar IL-6 pada penelitian ini ditetapkan dari darah sampel vena orbita tikus. Penetapan kadar IL-6 akan dilakukan dengan metode ELISA untuk mengetahui tingkat inflamasi. Reagen standar dan sampel disiapkan kemudian masing-masing dimasukkan ke dalam *well* dan diinkubasi. Penambahan *biotin-labeled antibody* dan macam *solution* kemudian dibaca pada alat *microplate* ELISA. Satuan hasil menggunakan pg/mL dengan skala rasio.

4.4 Bahan dan Instrumen Penelitian

4.4.1 Bahan Penelitian

1. Esktrak akar Ashwagandha
2. Akuabides

4.4.2 Instrumen untuk Perlakuan

1. Gavage oral: Alat pemberi dosis oral untuk memastikan pemberian ekstrak yang tepat.
2. Timbangan digital: Untuk menimbang berat badan tikus secara akurat guna menentukan dosis ekstrak.
3. Kit Enzim Antioksidan: Kit komersial untuk analisis aktivitas SOD dan IL-6 sesuai protokol.
4. ELISA Reader: Untuk analisis kadar sitokin proinflamasi (IL-6 dan SOD) menggunakan kit ELISA spesifik.
5. Centrifuge: Untuk pemisahan serum dari darah tikus.
6. Kandang hewan standar: Untuk menjaga kondisi lingkungan yang seragam bagi tikus.
7. Mikropipet: Untuk pengambilan volume sampel darah yang presisi.

4.5 Prosedur Penelitian

4.5.1 Perolahan *Ethical Clearance*

Ethical clearance penelitian diajukan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang

4.5.2 Ekstrak Akar Ashwagandha

Ekstrak akar ashwagandha yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari PT Mensa Binasukses, Pulogadung. Bahan baku ini telah dilengkapi dengan sertifikasi *Material Safety Data Sheet* (MSDS).

Ekstrak Ashwagandha akan dilarutkan dalam Carboxymethylcellulose 0.1%

4.5.3 Perlakuan pada Hewan Coba

Tikus akan dipelihara dalam kandang standar dan diberi pakan serta air minum secara ad libitum. Pakan yang digunakan adalah pakan padat dengan tambahan diet tinggi lemak untuk tikus kelompok 2,3 dan 4. Pakan diberikan dalam bentuk pellet padat dengan konsumsi rata-rata 20–25 gram per hari per ekor setara dengan tambahan 2ml kuning telur perhari. Pakan akan diberikan secara oral selama 28 hari. Tikus diaklimatisasi selama 7 hari sebelum perlakuan dimulai.

Tikus diinduksi model penuaan dengan menggunakan larutan D-Galactose dengan dosis 300 mg/kgBB (1 ml) setiap hari melalui sonde dengan kombinasi makanan tinggi lemak (60% energi yang dibutuhkan tikus atau 2 gram lemak per hari) yang diberikan melalui pellet dan tambahan 2ml kuning telur selama 28 hari. Induksi akan dilakukan selama 28 hari sehingga akan terjadi proses inflamasi. Induksi kemudian akan tetap diikuti perjalanan intervensi dari hari pertama hingga hari ke 28.

4.6 Tempat dan Waktu Penelitian

4.6.1 Tempat Penelitian

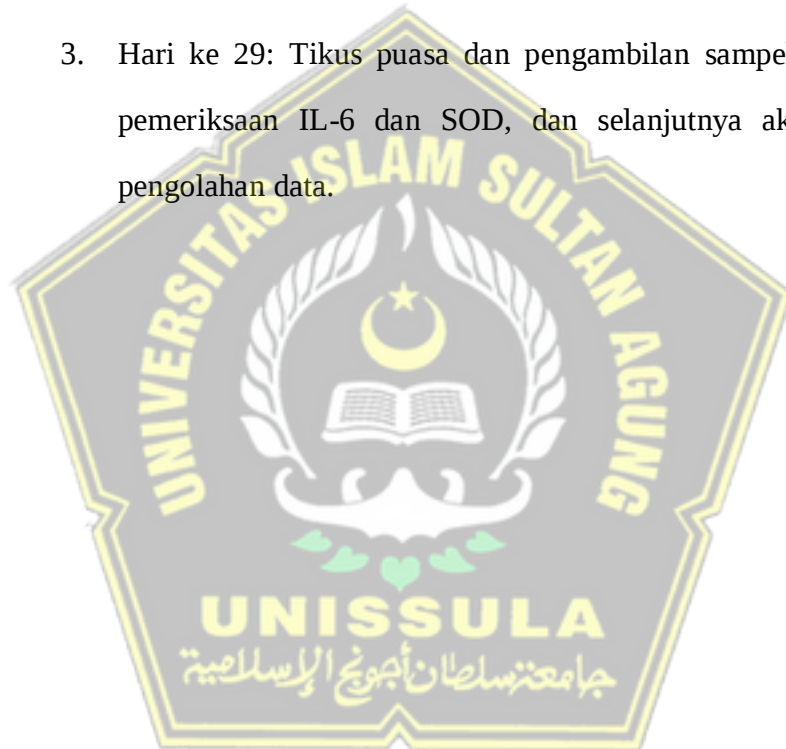
Pengambilan sampel penelitian dilakukan di Laboratorium IBL FK UNISSULA.

4.6.2 Waktu Penelitian

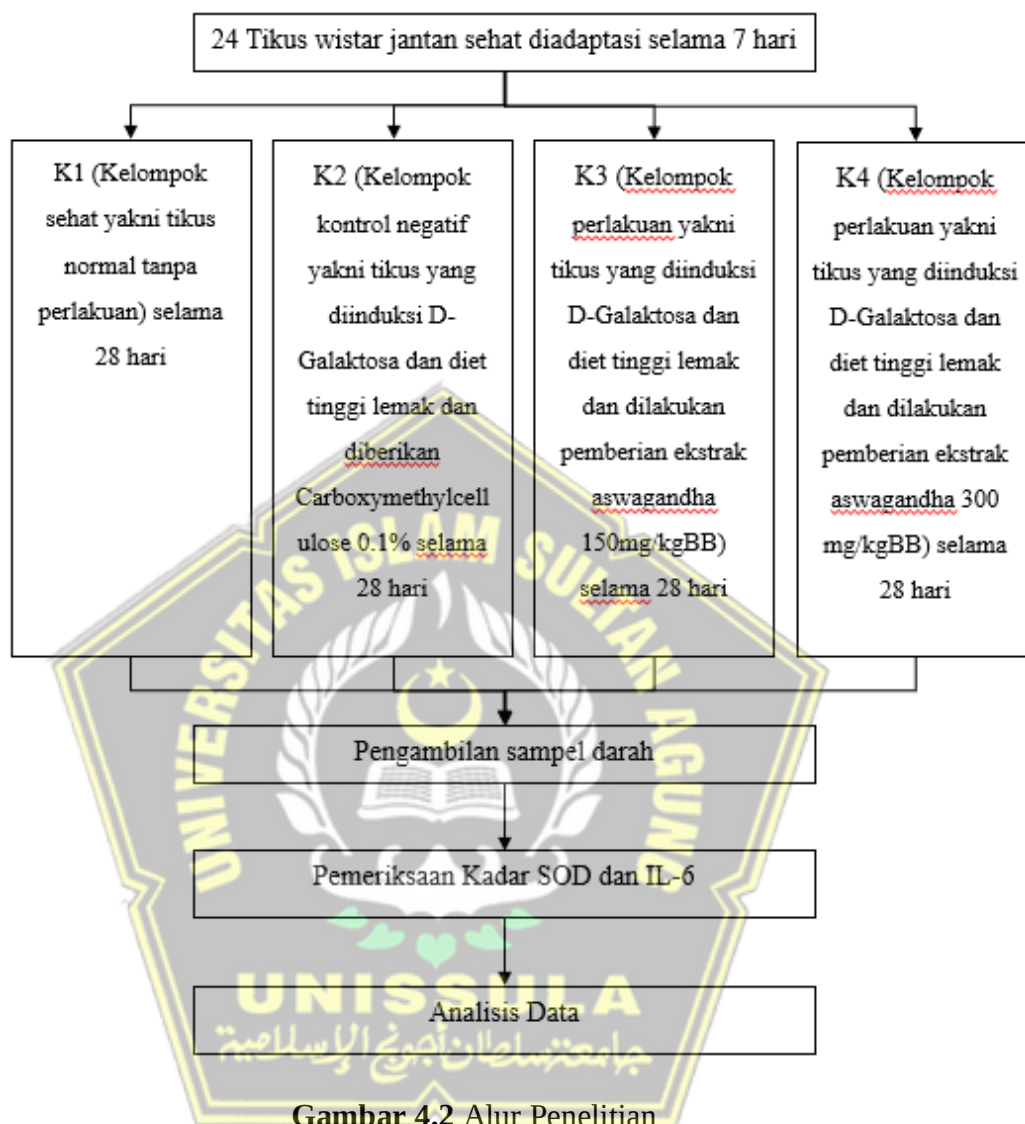
Penelitian ini dilakukan pada Januari 2025 hingga Agustus 2025.

Adapun jadwal penelitiannya adalah sebagai berikut:

1. Hari ke 1 sampai 28 : Induksi penuaan dengan D-Galactose dan makanan tinggi lemak melalui oral dan observasi keberhasilannya.
2. Hari ke 1 sampai 28 : Pemberian ekstrak akar ashwagandha sesuai dosis dan observasi harian.
3. Hari ke 29: Tikus puasa dan pengambilan sampel darah untuk pemeriksaan IL-6 dan SOD, dan selanjutnya akan dilakukan pengolahan data.



4.7 Alur Penelitian



4.8 Analisis Data

Data yang diperoleh dari lab CITO tanggal 24 Agustus 2025 akan dianalisis untuk mengetahui pengaruh ekstrak Ashwagandha terhadap SOD dan IL-6 pada tikus yang diinduksi D-Galaktosa dan diet tinggi lemak. Untuk analisis hasil *Superoksida Dismutase* (SOD) dilakukan uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* dilanjutkan dengan uji homogenitas varians dengan *Levene's Test* dilanjutkan dengan uji *Welch ANOVA*. Untuk

mengetahui perbedaan antara kelompok dilakukan uji *Post Hoc* Tamhane karena data terdistribusi normal tetapi tidak homogen. Analisis kadar *Interleukin-6* (IL-6) dilakukan uji normalitas dengan *Shapiro-Wilk* dilanjutkan uji homogenitas varians dengan *Levene's Test* karena data berdistribusi normal dan varians homogen, maka analisis dilanjutkan menggunakan uji *One Way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tukey* untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan signifikan satu sama lain. Data dianalisis menggunakan SPSS versi 26 dan pengelolaan awal dilakukan dengan *Microsoft Excel*.



BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh ekstrak akar Ashwagandha (*Withania somnifera*) terhadap kadar Superoksida Dismutase (SOD) dan Interleukin-6 (IL-6) pada model inflamaging yang diinduksi D-galaktosa dan diet tinggi lemak pada tikus Wistar jantan. Sebanyak 24 ekor tikus Wistar jantan sehat digunakan dalam penelitian ini. Sebelum perlakuan, seluruh tikus diadaptasi selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan lingkungan percobaan. Setelah masa adaptasi, tikus dibagi menjadi empat kelompok perlakuan. Kelompok K1 merupakan kelompok sehat (kontrol normal) tanpa induksi maupun perlakuan, yang dipelihara selama 28 hari. Kelompok K2 merupakan kontrol negatif, yaitu tikus yang diinduksi D-galaktosa dan diet tinggi lemak, serta diberikan *Na Carboxymethylcellulose* (NaCMC) 0,1% selama 28 hari. Kelompok K3 merupakan kelompok perlakuan dengan induksi D-galaktosa dan diet tinggi lemak, kemudian diberi ekstrak akar Ashwagandha dosis 150 mg/kgBB selama 28 hari. Sedangkan kelompok K4 juga diinduksi dengan D-galaktosa dan diet tinggi lemak, tetapi diberikan ekstrak akar Ashwagandha dosis 300 mg/kgBB selama 28 hari.

Pada akhir masa perlakuan, dilakukan pengambilan sampel darah dari seluruh hewan uji untuk pemeriksaan kadar SOD dan IL-6 menggunakan metode ELISA. Analisis data kemudian dilakukan untuk mengetahui pengaruh

pemberian ekstrak akar Ashwagandha terhadap biomarker stres oksidatif dan inflamasi pada model *inflammaging*. Penelitian ini tidak melakukan validasi karena menggunakan rancangan *post-test only control group design*. Induksi D-galaktosa yang dikombinasikan dengan diet tinggi lemak telah banyak digunakan sebagai model *inflammaging*, karena mampu menimbulkan stres oksidatif dan inflamasi sistemik yang menyerupai proses penuaan alami.

5.1.1 Kadar SOD pada Darah

Hasil analisis kadar *Superoksida Dismutase* (SOD) pada tabel 5.1 menunjukkan bahwa rerata tertinggi terdapat pada kelompok K1 ($2,28 \pm 0,131$ ng/L), diikuti oleh K3 ($1,56 \pm 0,033$ ng/L), K2 ($1,43 \pm 0,038$ ng/L), dan yang terendah pada kelompok K4 ($1,388 \pm 0,047$ ng/L). Uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* pada seluruh kelompok menunjukkan nilai $p > 0,05$ (K1: $p = 0,783$; K2: $p = 0,996$; K3: $p = 0,955$; K4: $p = 0,932$), sehingga dapat disimpulkan bahwa data berdistribusi normal. Uji homogenitas varians dengan *Levene's Test* memberikan hasil $p = 0,016$ ($p < 0,05$), yang berarti varians antar kelompok tidak homogen. Meskipun demikian, karena data terdistribusi normal, analisis tetap dapat dilanjutkan dengan uji *Welch ANOVA*. Hasil uji *Welch ANOVA* menunjukkan nilai $p < 0,001$ ($p < 0,05$), yang menandakan adanya perbedaan bermakna kadar SOD antar kelompok perlakuan. Dengan demikian, diperlukan uji lanjut *Post Hoc* untuk mengetahui perbedaan antar masing-masing kelompok secara lebih spesifik. Uji

Post Hoc menggunakan Tamhane karena data terdistribusi normal tetapi tidak homogen.

Tabel 5.1 Kadar SOD pada Darah

Variabel	Kelompok				<i>p value</i>
	K1	K2	K3	K4	
	Rerata±SD	Rerata±SD	Rerata±SD	Rerata±SD	
Kadar SOD (ng/L)	2,28 ± 0,131	1,43 ± 0,038	1,56 ± 0,033	1,388 ± 0,047	
<i>Saphiro Wilk</i>	0,783	0,996	0,955	0,932	
<i>Levene's Test</i>					0,016
<i>Welch ANOVA</i>					<0,001*

Keterangan:

*: signifikan

Shapiro Wilk: data terdistribusi normal $p \geq 0,050$

Levene's Test: data terdistribusi homogen $p \geq 0,050$

ANOVA: terdapat perbedaan bermakna $p < 0,050$

Berdasarkan hasil uji *Post Hoc Tamhane* terhadap kadar SOD (tabel 5.2), diperoleh perbedaan bermakna ($p < 0,05$) antara K1 dan K2, K1 dan K3, serta K1 dan K4. Selain itu, terdapat perbedaan bermakna antara K2 dan K3, serta antara K3 dan K4. Sementara itu, tidak ditemukan perbedaan bermakna antara K2 dan K4 ($p = 0,488$). Hasil ini menunjukkan bahwa kelompok sehat (K1) memiliki kadar SOD yang secara signifikan lebih tinggi dibandingkan seluruh kelompok lain (K2, K3, K4). Pemberian ekstrak akar Ashwagandha dosis 150 mg/kgBB (K3) meningkatkan kadar SOD secara signifikan dibanding kelompok kontrol negatif (K2), dan kadar SOD pada dosis 300 mg/kgBB (K4) juga lebih rendah dibanding K3, namun tidak berbeda signifikan dengan K2. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa pemberian

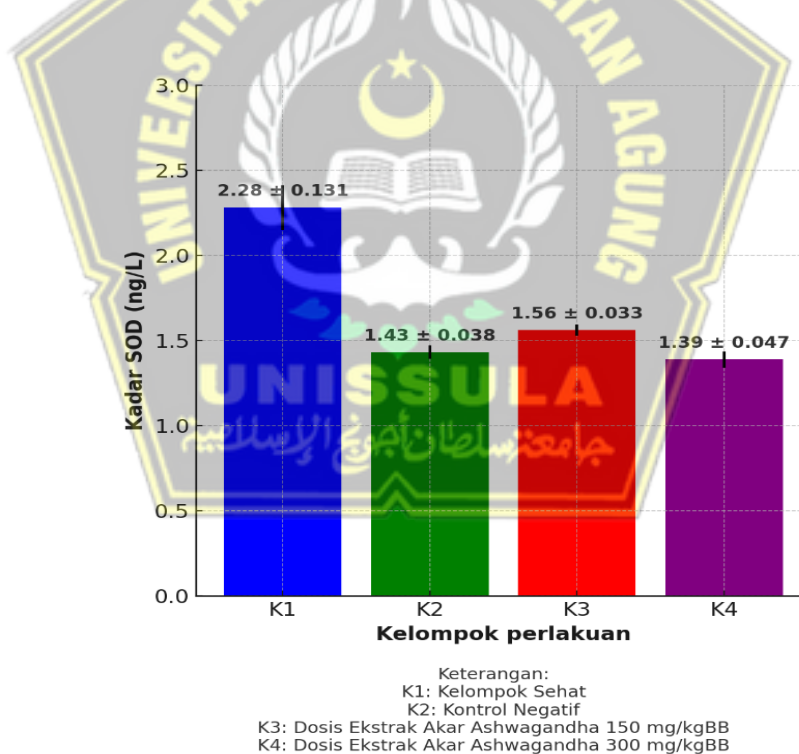
ekstrak akar Ashwagandha dosis 150 mg/kgBB memberikan efek peningkatan kadar SOD yang lebih baik dibanding kelompok negatif dan dosis 300 mg/kgBB, meskipun tetap lebih rendah dibanding kelompok sehat.

Tabel 5.2 Uji Post Hoc Tamhane Kadar SOD

Kadar SOD				
Kelompok	K1	K2	K3	K4
K1	-	<0,001*	<0,001*	<0,001*
K2		-	<0,001*	0,488
K3			-	<0,001*
K4				-

Keterangan:

*: terdapat perbedaan yang signifikan, $p < 0,050$



Gambar 5.1 Kadar SOD pada Darah

5.1.2 Kadar IL-6 pada Darah

Hasil analisis kadar *Interleukin-6* (IL-6) pada tabel 5.3 menunjukkan bahwa rerata tertinggi terdapat pada kelompok K2 (7,10

$\pm 0,46$ ng/L), diikuti oleh K4 ($5,51 \pm 0,39$ ng/L), K1 ($5,21 \pm 0,11$ ng/L), dan terendah pada kelompok K3 ($4,61 \pm 0,51$ ng/L) (tabel 5.3). Uji normalitas dengan *Shapiro-Wilk* menunjukkan bahwa seluruh kelompok memiliki nilai $p > 0,05$ (K1: $p=0,421$; K2: $p=0,058$; K3: $p=0,304$; K4: $p=0,910$), sehingga dapat disimpulkan bahwa data berdistribusi normal. Uji homogenitas varians dengan *Levene's Test* memberikan hasil $p=0,482$ ($p > 0,05$), yang berarti varians antar kelompok homogen. Karena data berdistribusi normal dan varians homogen, maka analisis dilanjutkan menggunakan uji *One Way ANOVA*. Hasil uji *One Way ANOVA* menunjukkan nilai $p < 0,001$ ($p < 0,05$), yang menandakan adanya perbedaan bermakna kadar IL-6 antar kelompok perlakuan. Oleh karena itu, analisis perlu dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tukey* untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan signifikan satu sama lain.

Tabel 5.3 Kadar IL-6 pada Darah

Variabel	Kelompok				<i>p value</i>
	K1	K2	K3	K4	
	Rerata $\pm$ SD	Rerata $\pm$ SD	Rerata $\pm$ SD	Rerata $\pm$ SD	
Kadar IL-6 (ng/L)	$5,21 \pm 0,11$	$7,10 \pm 0,46$	$4,61 \pm 0,51$	$5,51 \pm 0,39$	
<i>Saphiro Wilk</i>	0,421	0,058	0,304	0,910	
<i>Levene's Test</i>					0,482
<i>One Way ANOVA</i>					<0,001*

Keterangan:

*: signifikan

Shapiro Wilk: data terdistribusi normal $p \geq 0,050$

Levene's Test: data terdistribusi homogen $p \geq 0,050$

ANOVA: terdapat perbedaan bermakna $p < 0,050$

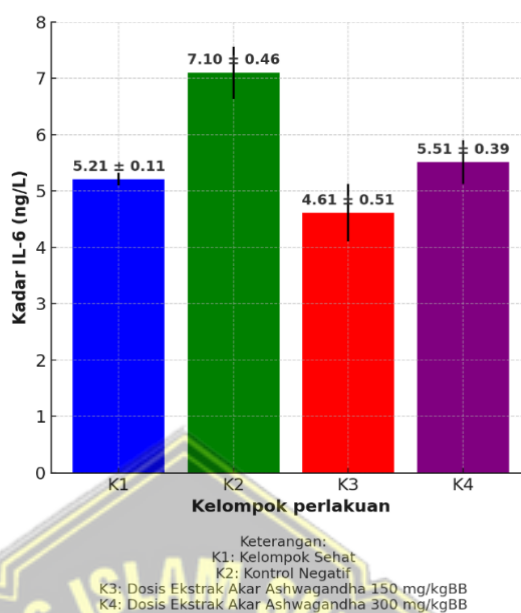
Berdasarkan hasil uji *Post Hoc Tukey* terhadap kadar IL-6, diperoleh perbedaan bermakna ($p < 0,05$) antara K1 dan K2, K2 dan K3, K2 dan K4, serta K3 dan K4. Tidak terdapat perbedaan bermakna antara K1 dengan K3 ($p = 0,081$) maupun K1 dengan K4 ($p = 0,587$). Hasil ini menunjukkan bahwa kelompok kontrol negatif (K2) memiliki kadar IL-6 yang secara signifikan lebih tinggi dibandingkan kelompok sehat (K1) maupun kelompok perlakuan dengan ekstrak akar Ashwagandha dosis 150 mg/kgBB (K3) dan 300 mg/kgBB (K4). Selain itu, terdapat perbedaan signifikan antara K3 dan K4, yang mengindikasikan bahwa dosis ekstrak 150 mg/kgBB (K3) memberikan penurunan kadar IL-6 yang lebih kuat dibanding dosis 300 mg/kgBB (K4). Dengan demikian, pemberian ekstrak akar Ashwagandha terbukti mampu menurunkan kadar IL-6 secara signifikan pada tikus *model inflamaging*, terutama pada dosis 150 mg/kgBB, sehingga mendukung potensi efek antiinflamasi ekstrak tersebut.

Tabel 5.4 Uji *Post Hoc Tukey* Kadar IL-6

Kadar IL-6				
Kelompok	K1	K2	K3	K4
K1	-	<0,001*	0,081	0,587
K2		-	<0,001*	<0,001*
K3			-	0,005*
K4				-

Keterangan:

*: terdapat perbedaan yang signifikan, $p < 0,050$



Gambar 5.2 Kadar IL-6 pada Darah

5.2 Pembahasan

Induksi D-galaktosa dan diet tinggi lemak pada model hewan penelitian ini terbukti efektif dalam membentuk kondisi stres oksidatif yang menyerupai *accelerated aging* atau *inflammaging*. D-galaktosa diketahui meningkatkan akumulasi *Reactive Oxygen Species* (ROS), terutama anion superoksida (O_2^-), melalui jalur metabolisme abnormal. ROS yang berlebih akan bereaksi dengan biomolekul penting, menyebabkan kerusakan DNA, protein, dan lipid, serta mempercepat disfungsi mitokondria. Kondisi ini diperburuk dengan diet tinggi lemak, yang meningkatkan peroksidasi lipid dan menghasilkan lebih banyak radikal bebas. Kombinasi keduanya menciptakan lingkungan dengan stres oksidatif kronis yang secara konsisten menurunkan kapasitas pertahanan enzim antioksidan endogen.³⁶

Superoksida Dismutase (SOD) merupakan enzim antioksidan utama yang berperan mengkatalisis dismutasi anion superoksida menjadi hidrogen peroksida dan oksigen, sehingga mencegah kerusakan sel akibat radikal bebas. Penurunan kadar SOD pada kelompok kontrol negatif (K2) dibanding kelompok sehat (K1) menunjukkan bahwa induksi D-galaktosa dan diet tinggi lemak berhasil menekan aktivitas antioksidan tubuh. Temuan ini konsisten dengan laporan Li dkk. (2020) yang menemukan bahwa paparan D-galaktosa kronis menurunkan aktivitas SOD dan katalase secara signifikan pada jaringan otak dan hati tikus, disertai peningkatan malondialdehid (MDA) sebagai penanda kerusakan oksidatif.³⁷

Pemberian ekstrak akar Ashwagandha (*Withania somnifera*) memberikan efek protektif, terutama pada dosis 150 mg/kgBB (K3) yang terbukti meningkatkan kadar SOD secara signifikan dibandingkan K2. Mekanisme ini erat kaitannya dengan kandungan *withanolides*, kelompok steroidal lactones yang bekerja sebagai antioksidan dan adaptogen. *Withanolides* dapat menstimulasi aktivasi faktor transkripsi *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2). Aktivasi Nrf2 mendorong transkripsi gen yang mengkode enzim antioksidan seperti SOD, katalase (CAT), dan glutathione peroxidase (GPx). Hal ini menjelaskan peningkatan SOD pada K3.³⁸ Studi lain juga melaporkan bahwa suplementasi Ashwagandha pada model stres oksidatif meningkatkan ekspresi Nrf2 dan enzim antioksidan, sekaligus menurunkan MDA sebagai penanda kerusakan oksidatif.³⁹

Pada dosis 300 mg/kgBB (K4), peningkatan kadar SOD tidak lebih baik daripada K3, bahkan cenderung lebih rendah dan tidak bermakna dengan kontrol negative (K2). Ketika dosis ditingkatkan menjadi 300 mg/kgBB, jumlah molekul withanolides jauh melebihi jumlah reseptor yang tersedia. Semua reseptor telah terisi penuh. Penambahan molekul lagi tidak akan menghasilkan peningkatan sinyal untuk menghambat produksi IL-6. Fenomena ini dapat dipahami melalui konsep “hormesis” atau kurva respon berbentuk U. Pada dosis rendah hingga sedang, senyawa bioaktif dalam Ashwagandha mampu menginduksi respons protektif, tetapi pada dosis tinggi, justru dapat memicu efek pro-oksidan.⁴⁰ Hal ini dapat terjadi melalui akumulasi metabolit redoks aktif atau beban metabolisme seluler yang berlebihan. Fenomena serupa juga telah dilaporkan pada antioksidan lain seperti vitamin C dan flavonoid polifenol, yang pada dosis berlebih dapat memicu ROS alih-alih menetralkannya. Dengan demikian, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa Ashwagandha lebih efektif pada dosis 150mg/kgBB dibandingkan dosis 300mg/kgBB dalam memperbaiki stres oksidatif terutama peningkatan kadar SOD.⁴¹

Selain penurunan pertahanan antioksidan, induksi D-galaktosa dan diet tinggi lemak juga memicu peningkatan kadar sitokin proinflamasi, salah satunya *Interleukin-6* (IL-6). IL-6 adalah sitokin pleiotropik yang berperan penting dalam fase akut peradangan, rekrutmen sel imun (neutrofil, makrofag), dan aktivasi respon imun adaptif. Pada *inflammaging*, IL-6 dikenal sebagai salah satu biomarker utama penuaan patologis, di mana peningkatan kadar IL-

6 berhubungan dengan penurunan fungsi organ, penyakit kardiovaskular, sindrom metabolik, dan fragilitas pada lansia.⁴²

Kadar IL-6 tertinggi pada penelitian ini ditemukan pada kelompok kontrol negatif (K2), berbeda signifikan dengan kelompok sehat (K1) maupun kelompok perlakuan ekstrak Ashwagandha. Hasil ini membuktikan terjadinya peningkatan kadar IL 6 pada induksi d galaktosa dan diet tinggi lemak. Peningkatan ini dapat dijelaskan melalui aktivasi nuclear factor- κ B (NF- κ B) akibat stres oksidatif. ROS yang meningkat akan memicu aktivasi NF- κ B di sitoplasma, yang kemudian berpindah ke inti sel dan menginduksi ekspresi gen proinflamasi termasuk IL-6, TNF- α , dan IL-1 β .^{43,44} Studi melaporkan bahwa tikus yang diinduksi D-galaktosa mengalami peningkatan ekspresi NF- κ B dan kadar IL-6 serum.⁴⁴

Pemberian ekstrak Ashwagandha terbukti menurunkan kadar IL-6 secara signifikan. Dosis 150 mg/kgBB (K3) menghasilkan penurunan terbesar dan setara dengan kelompok sehat (K1), sedangkan dosis 300 mg/kgBB (K4) juga menurunkan IL-6 namun efeknya lebih rendah. Hal ini mengindikasikan adanya efek optimal pada dosis 150mg/kgBB. Senyawa aktif dalam Ashwagandha, seperti withanolides, diketahui dapat menghambat aktivasi NF- κ B dengan meningkatkan aktivitas IKK (I κ B) inhibitor yang akan menyebabkan I κ B tidak dapat dibentuk, serta menurunkan ekspresi enzim proinflamasi (iNOS, COX-2). Selain itu, Ashwagandha juga mampu meningkatkan ekspresi sitokin antiinflamasi seperti IL-10, sehingga memperbaiki keseimbangan antara proinflamasi dan antiinflamasi.⁴⁵

Hasil yang menunjukkan dosis 150 mg/kgBB lebih efektif daripada 300 mg/kgBB kembali memperkuat konsep respon non-linear. Dosis yang lebih tinggi tidak selalu berarti efek lebih baik; pada kondisi tertentu, pemberian dosis besar justru dapat mengaktifkan mekanisme kompensasi tubuh atau bahkan menimbulkan efek sitotoksik ringan yang mengurangi efektivitas antiinflamasi. Ketika dosis ditingkatkan menjadi 300 mg/kgBB, jumlah molekul withanolides jauh melebihi jumlah reseptor yang tersedia. Semua reseptor telah "jenuh" atau terisi penuh. Penambahan molekul lagi tidak akan menghasilkan peningkatan sinyal untuk memproduksi lebih banyak SOD. Sebaliknya, dosis yang berlebihan ini dapat memicu mekanisme regulasi umpan balik negatif (feedback inhibition) di mana sel akan menurunkan produksinya sendiri untuk mencegah akumulasi produk yang berlebihan. Temuan ini juga sejalan dengan meta-analisis uji klinis yang melaporkan bahwa suplementasi Ashwagandha secara konsisten menurunkan IL-6 serum pada berbagai kondisi inflamasi, namun efeknya bergantung pada dosis dan durasi intervensi.⁴⁶

Penelitian ini membuktikan bahwa induksi D-galaktosa yang dikombinasikan dengan diet tinggi lemak efektif dalam membentuk kondisi *inflammaging*, sebagaimana ditunjukkan oleh peningkatan stres oksidatif dan inflamasi sistemik yang terukur melalui penurunan kadar SOD dan peningkatan IL-6. Intervensi berupa pemberian ekstrak akar Ashwagandha (*Withania somnifera*) mampu memperbaiki ketidakseimbangan tersebut, terutama pada dosis 150 mg/kgBB yang menunjukkan efek paling konsisten

dalam meningkatkan kapasitas antioksidan dan menekan respon inflamasi. Temuan ini menekankan bahwa efektivitas Ashwagandha bersifat dosis-spesifik, sehingga pemilihan dosis yang tepat merupakan faktor penting untuk memperoleh manfaat terapeutik yang optimal.

Penelitian ini memiliki keterbatasan waktu, parameter biomarker lain seperti status metabolik (kadar gula darah, kadar lemak tubuh), status inflamasi (IL-1 β , CRP) status antiinflamasi (IL-10, TGF- β). Dalam penelitian ini evaluasi histopatologis jaringan belum diikutsertakan, sehingga gambaran komprehensif mengenai mekanisme molekuler dan dampak sistemik belum sepenuhnya terungkap. Dalam penelitian ini juga belum dilakukan pre test dan post test sehingga gambaran inflamaging belum sepenuhnya terungkap.

Dengan mempertimbangkan hal tersebut, penelitian lanjutan dengan analisis waktu yang lebih Panjang dan dengan pemeriksaan rutin, multi-biomarker, serta integrasi pendekatan histopatologis, molekuler dan pemeriksaan pretest dan post test diperlukan untuk mengonfirmasi serta memperluas temuan ini. Walaupun demikian, hasil penelitian ini telah memberikan kontribusi penting dengan menunjukkan potensi Ashwagandha sebagai agen antioksidan dan antiinflamasi yang menjanjikan dalam konteks penuaan yang dipercepat terutama dalam proses *inflammaging*.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

1. Pemberian ekstrak Ashwagandha berpengaruh terhadap kadar SOD dan IL-6 pada tikus yang diinduksi D Galaktosa dan diet tinggi lemak terutama pada dosis 150mg/kgBB.
2. Pemberian ekstrak akar Ashwagandha (*Withania somnifera*) dengan dosis 150mg/kgBB berpengaruh terhadap kadar Superoksida Dismutase (SOD) pada tikus Wistar jantan yang diinduksi D-galaktosa dan diet tinggi lemak. Pemberian Ashwaganda dosis 300 mg/kgBB tidak berpengaruh terhadap kadar SOD pada tikus Wistar jantan yang diinduksi D-galaktosa dan diet tinggi lemak.
3. Pemberian ekstrak akar Ashwagandha berpengaruh terhadap kadar Interleukin-6 (IL-6) baik pada dosis 150mg/kgBB dan 300mg/kgBB.
4. Induksi D-galaktosa dan diet tinggi lemak terbukti menurunkan kapasitas antioksidan dan meningkatkan inflamasi, sedangkan Ashwagandha mampu memperbaiki kedua kondisi tersebut dengan efek protektif yang berbeda sesuai dosis, yaitu 150 mg/kgBB lebih optimal meningkatkan SOD dan menurunkan IL-6, sementara 300 mg/kgBB hanya efektif menurunkan IL-6.

6.2 Saran

1. Pada penelitian selanjutnya diharapkan dapat dilakukan penelitian dengan analisis multi-biomarker lainnya yang berhubungan dengan inflammaging seperti status metabolik (kadar gula darah, kadar lemak tubuh), status inflamasi (IL-1 β , CRP) status antiinflamasi (IL-10, TGF- β).
2. Analisis histopatologis jaringan sebaiknya dilakukan untuk mengevaluasi ekspresi SOD dan IL-6 secara langsung pada tingkat seluler, sehingga hasil biokimia dapat diperkuat dengan bukti morfologis dan imunohistokimia.
3. Variasi dosis dan durasi pemberian ekstrak Ashwagandha perlu dieksplorasi lebih lanjut terutama pada dosis yang lebih rendah dari 150mg/kg BB guna menentukan dosis optimal dengan efek protektif maksimal tanpa menimbulkan potensi efek samping.
4. Pemeriksaan dengan pre Test, post Test dengan data longitudinal diharapkan dapat dilakukan pada penelitian selanjutnya untuk memperkuat bukti pemberian Ashwagandha pada tikus yang diinduksi D-Galaktosa dan diet tinggi lemak dapat menghambat proses *Inflamaging*.

DAFTAR PUSTAKA

1. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The Hallmarks of Aging. *Cell*. 2013;153(6):1194–217.
2. Guo J, Huang X, Dou L, Yan M, Shen T, Tang W, et al. Aging and Aging-Related Diseases: from Molecular Mechanisms to Interventions and Treatments. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2022 Dec 16;7(1):391.
3. Di Micco R, Krizhanovsky V, Baker D, d'Adda di Fagagna F. Cellular Senescence in Ageing: from Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2021 Feb 16;22(2):75–95.
4. Franceschi C, Campisi J. Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 2014 Jun 1;69(Suppl 1):S4–9.
5. Liochev SI. Reactive Oxygen Species and the Free Radical Theory of Aging. *Free Radical Biology and Medicine*. 2013 Jul;60:1–4.
6. Panossian AG, Efferth T, Shikov AN, Pozharitskaya ON, Kuchta K, Mukherjee PK, et al. Evolution of the Adaptogenic Concept from Traditional Use to medical systems: Pharmacology of stress-and Aging-Related Diseases. *Medicinal Research Reviews*. 2021 Jan 25;41(1):630–703.
7. Choudhary D, Bhattacharyya S, Bose S. Efficacy and Safety of Ashwagandha (*Withania somnifera* (L.) Dunal) Root Extract in Improving Memory and Cognitive Functions. *Journal of Dietary Supplements*. 2017 Nov 2;14(6):599–612.
8. Speers AB, Cabey KA, Soumyanath A, Wright KM. Effects of *Withania somnifera* (Ashwagandha) on Stress and the Stress- Related Neuropsychiatric Disorders Anxiety, Depression, and Insomnia. *Current Neuropharmacology*. 2021 Sep;19(9):1468–95.
9. Singh M, Jayant K, Singh D, Bhutani S, Poddar NK, Chaudhary AA, et al. *Withania somnifera* (L.) Dunal (Ashwagandha) for the Possible Therapeutics and Clinical Management of SARS-CoV-2 Infection: Plant-Based Drug Discovery and Targeted Therapy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2022 Aug 15;12:933824.

10. Leyane TS, Jere SW, Houreld NN. Oxidative Stress in Ageing and Chronic Degenerative Pathologies: Molecular Mechanisms Involved in Counteracting Oxidative Stress and Chronic Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022 Jun 30;23(13):7273.
11. Baghalpour N, Bakhtiyari JM, Almarhoon ZM, Chandran D, Shinwari AK, Kumar M, et al. Antinociceptive, Anti-Inflammatory, and Antioxidant Studies on *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Pakistan Journal of Botany*. 2023 Aug 15;55(4):1551–61.
12. Gupta V, Srivastava R. Ashwagandha Diminishes Hippocampal Apoptosis Induced by Microwave Radiation by Acetylcholinesterase Dependent Neuro-Inflammatory Pathway in Male *Coturnix coturnix Japonica*. *Neurochemical Research*. 2024 Jul 20;49(7):1687–702.
13. Suganya K. Regulation of Pro and Anti-Inflammatory Signaling Molecules in Effect of *Withania Somnifera* Root Extract Treated Sleep Deprivation Induced Wistar Rats. *Bioinformation*. 2020 Nov 30;16(11):856–62.
14. Dutta K, Patel P, Julien JP. Protective Effects of *Withania somnifera* Extract in SOD1G93A Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Experimental Neurology*. 2018 Nov;309:193–204.
15. Gupta A, Singh S. Evaluation of Anti-Inflammatory Effect of *Withania somnifera* Root on Collagen-Induced Arthritis in Rats. *Pharmaceutical biology*. 2014 Mar;52(3):308–20.
16. Zheng M, Liu Y, Zhang G, Yang Z, Xu W, Chen Q. The Applications and Mechanisms of Superoxide Dismutase in Medicine, Food, and Cosmetics. *Antioxidants*. 2023 Aug 27;12(9):1675.
17. Islam MN, Rauf A, Fahad FI, Emran T Bin, Mitra S, Olatunde A, et al. Superoxide Dismutase: an Updated Review on Its Health Benefits and Industrial Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2022 Sep 12;62(26):7282–300.
18. Rosa AC, Corsi D, Cavi N, Bruni N, Dosio F. Superoxide Dismutase Administration: A Review of Proposed Human Uses. *Molecules*. 2021 Mar 25;26(7):1844.
19. Ridker PM, Rane M. Interleukin-6 Signaling and Anti-Interleukin-6 Therapeutics in Cardiovascular Disease. *Circulation Research*. 2021 May 28;128(11):1728–46.
20. Kistner TM, Pedersen BK, Lieberman DE. Interleukin 6 as An Energy Allocator in Muscle Tissue. *Nature Metabolism*. 2022 Feb 24;4(2):170–9.

21. Lyra e Silva NM, Gonçalves RA, Pascoal TA, Lima-Filho RAS, Resende E de PF, Vieira ELM, et al. Pro-Inflammatory Interleukin-6 Signaling Links Cognitive Impairments and Peripheral Metabolic Alterations in Alzheimer's Disease. *Translational Psychiatry*. 2021 Apr 28;11(1):251.
22. Mittler R, Zandalinas SI, Fichman Y, Van Breusegem F. Reactive Oxygen Species Signalling in Plant Stress Responses. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2022 Oct 27;23(10):663–79.
23. Blackburn, H. E, Epel ES, Lin J. Human Telomere Biology: A Contributory and Interactive Factor in Aging, Disease Risks, and Protection. *Science*. 2015;350(6265):1193–8.
24. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. Hallmarks of Aging: An Expanding Universe. *Cell*. 2020;186(2):243–78.
25. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free Radicals in Biology and Medicine*. USA: Oxford University Press; 2015.
26. Nita M, Grzybowski A. The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016;2016(1):3164734.
27. Heneka MT, Carson MJ, Khoury J El, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *The Lancet Neurology*. 2015 Apr;14(4):388–405.
28. Jomova K, Raptova R, Alomar SY, Alwasel SH, Nepovimova E, Kuca K, et al. Reactive Oxygen Species, Toxicity, Oxidative Stress, and Antioxidants: Chronic Diseases and Aging. *Archives of Toxicology*. 2023 Oct 19;97(10):2499–574.
29. Hou K, Wu ZX, Chen XY, Wang JQ, Zhang D, Xiao C, et al. Microbiota in Health and Diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2022 Apr 23;7(1):135.
30. Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age with Human's. *International journal of preventive medicine*. 2013 Jun;4(6):624–30.
31. De Oliveira C, Vertematti MA, Olmo RP, Ventura F V, Proença ARG, Velloso LA, et al. Hypothalamic Inflammation Triggered by High-Fat Diet Involves TLR4 Signaling. *Endocrinology*. 2012 Feb 21;153(4):1640–1650.
32. Kesh SB, Sarkar D, Manna K. High-Fat Diet-Induced Oxidative Stress in the Liver via NADPH Oxidase and Mitochondria. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2016;9(1):38–43.

33. Moreno-Fernández S, Garcés-Rimón M, Vera G, Astier J, Landrier JF, Miguel M. High Fat/High Glucose Diet Induces Metabolic Syndrome in an Experimental Rat Model. *Nutrients*. 2018 Oct 14;10(10):1502.
34. Kwon Y, Lee M, Lim YH, Lee Y, Park Y, Lee JH, et al. High-Fat-Diet–Induced Oxidative Stress Linked to the Increased Colonization of *Lactobacillus sakei* in an Obese Population. Cuomo CA, editor. *Front Microbiol*. 2021 Sep 3;12:745011.
35. Bo-Htay C, Lee SY, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Oxidative Stress and Antioxidant Interventions in Cardiac Aging: An Updated Review. *Aging Dis*. 2018;9(6):166–88.
36. Budni J, Pacheco R, da Silva S, Garcez ML, Mina F, Bellettini-Santos T, et al. Oral administration of D-galactose induces cognitive impairments and oxidative damage in rats. *Behavioural Brain Research*. 2016 Apr 1;302:35–43.
37. Hadzi-Petrushev N, Stojkovski V, Mitrov D, Mladenov M. D-galactose induced changes in enzymatic antioxidant status in rats of different ages. *Physiol Res*. 2015;64(1):61–70.
38. Sun GY, Li R, Cui J, Hannink M, Gu Z, Fritsche KL, et al. *Withania somnifera* and Its Withanolides Attenuate Oxidative and Inflammatory Responses and Up-Regulate Antioxidant Responses in BV-2 Microglial Cells. *Neuromolecular Med* [Internet]. 2016;18(3):241–52. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12017-016-8411-0>
39. Khalil HMA, Eliwa HA, El-Shiekh RA, Al-Mokaddem AK, Hassan M, Tawfek AM, et al. *Ashwagandha* (*Withania somnifera*) root extract attenuates hepatic and cognitive deficits in thioacetamide-induced rat model of hepatic encephalopathy via induction of Nrf2/HO-1 and mitigation of NF- κ B/MAPK signaling pathways. *J Ethnopharmacol*. 2021 Sep 15;277.
40. Agathokleous E, Calabrese EJ. Hormesis: The dose response for the 21st century: The future has arrived. Vol. 425, *Toxicology*. Elsevier Ireland Ltd; 2019.
41. Skaperda Z, Tekos F, Vardakas P, Nepka C, Kouretas D. Reconceptualization of hormetic responses in the frame of redox toxicology. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2022.
42. Minciullo PL, Catalano A, Mandraffino G, Casciaro M, Crucitti A, Maltese G, et al. Inflammaging and Anti-Inflammaging: The Role of Cytokines in Extreme Longevity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* [Internet].

2016;64(2):111–26. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00005-015-0377-3>

43. Gao J, Zhou R, You X, Luo F, He H, Chang X, et al. Salidroside suppresses inflammation in a D-galactose-induced rat model of Alzheimer's disease via SIRT1/NF- κ B pathway. *Metab Brain Dis* [Internet]. 2016;31(4):771–8. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11011-016-9813-2>
44. Gama AW, Akib R, Khaera U. The Effect of Giving D-Galactose as an Aging Inducer on Body Weight, Glucose Levels and Interleukin-6 Levels in Wistar Rats. *Journal of Community Health Provision*. 2025 Apr 11;5(1):1–8.
45. Sikandan A, Shinomiya T, Nagahara Y. Ashwagandha root extract exerts anti-inflammatory effects in HaCaT cells by inhibiting the MAPK/NF- κ B pathways and by regulating cytokines. *Int J Mol Med*. 2018 Jul 1;42(1):425–34.
46. Lopresti AL, Smith SJ. Ashwagandha (*Withania somnifera*) for the treatment and enhancement of mental and physical conditions: A systematic review of human trials. Vol. 28, *Journal of Herbal Medicine*. Elsevier GmbH; 2021.
47. Saleem S, Muhammad G, Hussain MA, Altaf M, Bukhari SNA. *Withania somnifera* L.: Insights into the phytochemical profile, therapeutic potential, clinical trials, and future prospective. *Iran J Basic Med Sci*. 2020 Dec;23(12):1501-1526. doi: 10.22038/IJBMS.2020.44254.10378. PMID: 33489024; PMCID: PMC7811807.

