

**PENGARUH EKSTRAK AKAR ASHWAGANDHA
(*Withania Somnifera*) TERHADAP KADAR
GLUTHATIONE PEROXIDASE (GP_x) DAN TUMOR
NECROSIS FACTOR ALPHA (TNF- α)
(Studi Eksperimen *Inflammaging* pada Tikus Jantan Galur Wistar
yang Diinduksi D-Galaktose dan Diet Tinggi Lemak)**

Tesis

Untuk memenuhi syarat mencapai derajat Magister (S2)



Magister Biomedik

**Ayu Rizqi Nurul Iriani
MBK. 2423010432**

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

TESIS

PENGARUH EKSTRAK AKAR ASHWAGANDHA (*Withania Somnifera*) TERHADAP KADAR GLUTHATIONE PEROXIDASE (GPx) DAN TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA (TNF- α)
(Studi Eksperimen *Inflammaging* pada Tikus Jantan Galur Wistar yang Diinduksi D-Galaktose dan Diet Tinggi Lemak)

Disusun Oleh:

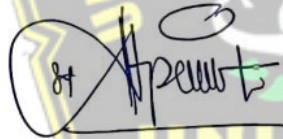
Ayu Rizqi Nurul Iriani
MBK2423010432

Yang dipertahankan di depan Tim Penguji
Senin, 1 September 2025
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Telah disetujui oleh:

Pembimbing I

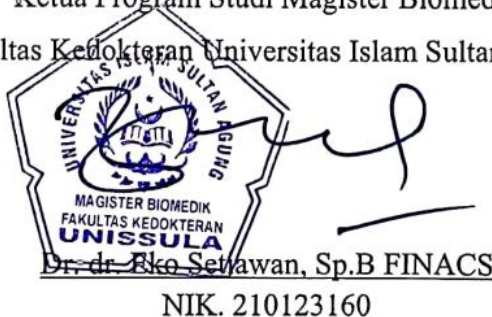
Pembimbing II



Prof. Dr. Siti Thomas Zulaikhah, S.K.M., M.Kes Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes
NIK. 210109119 NIK. 210198046

Mengetahui,

Ketua Program Studi Magister Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung



Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B FINACS
NIK. 210123160

SURAT PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa proposal tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri yang 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, 2 September 2025



Ayu Rizqi Nurul Iriani



KATA PENGANTAR

Alhamdulillah rabbil ‘alamin, puji dan syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya, akhirnya Penulis dapat menyelesaikan penyusunan proposal tesis yang berjudul Pengaruh Ekstrak Ashwagandha (*Withania Somnifera*) terhadap Kadar Gluthatione Peroxidase (GPx) dan Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) (Studi Eksperimen *Inflammaging* pada Tikus Jantan Galur Wistar yang Diinduksi D-Galaktose dan Diet Tinggi Lemak).

Proposal tesis ini ditulis dalam rangka memenuhi persyaratan untuk memperoleh gelar Magister Biomedik (M. Biomed) program Pascasarjana Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

Penulis menyadari bahwa proposal tesis dapat diselesaikan berkat dukungan dan bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, Penulis menyampaikan terima kasih kepada semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung memberikan kontribusi dalam menyelesaikan proposal tesis ini. Selanjutnya ucapan terima kasih 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 program pascasarjana Magister Biomedik.
2. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, SH. Sp.KF selaku dekan Fakultas Kedokteran UNISSULA yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti pendidikan program pascasarjana Magister Biomedik.

3. Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B FINACS selaku ketua Program Studi Magister Biomedik yang telah memberikan kesempatan Penulis untuk mengikuti pendidikan program pascasarjana Magister Biomedik.
4. Pembimbing Prof. Dr. Siti Thomas Zulaikhah, S.K.M., M.Kes dan Dr.dr. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes yang telah membimbing, mengarahkan, memberi saran serta meluangkan waktu, dan tenaga dalam menyusun proposal tesis ini.
5. Dr. dr. Hj. Chodidjah M. Kes selaku penguji pertama yang sudah bersedia meluangkan waktunya untuk saya.
6. Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B FINACS selaku penguji kedua yang sudah bersedia meluangkan waktunya untuk saya.
7. Prof. Dr. Dra. Atina Husaana, M.Si., Apt selaku penguji ketiga yang sudah bersedia meluangkan waktunya untuk saya.
8. Seluruh Dosen dan Civitas Academica Program Studi Magister Biomedik.
9. Suamiku tercinta Ari Sentani, Mama, Ayah, Ibuk, Bapak, dan anak-anak saya tercinta serta seluruh keluarga yang telah memberi dukungan dan do'a.
10. Teman sejawat S2 yang telah memberi sumbangsih ide, saran, dan kritik serta semangat kepada Penulis dalam menyelesaikan studi ini.
11. Semua pihak yang telah banyak membantu Penulis dalam menyelesaikan penyusunan proposal tesis ini.

Dengan keterbatasan pengalaman, ilmu maupun pustaka yang ditinjau, Penulis menyadari bahwa tesis ini masih banyak kekurangan dan pengembangan lanjut agar benar benar bermanfaat. Oleh sebab itu, penulis sangat mengharapkan

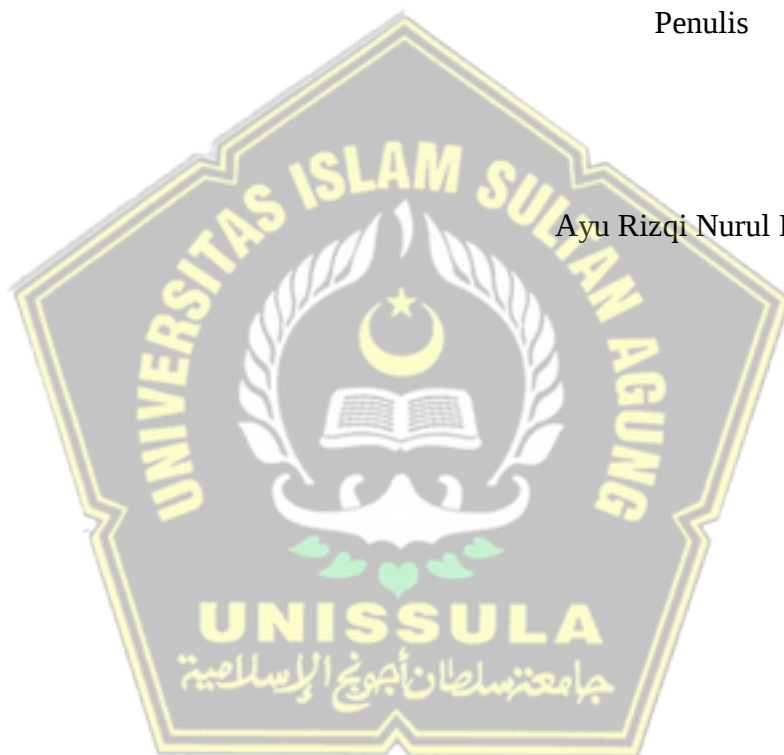
kritik dan saran agar hasil ini lebih sempurna serta sebagai masukan bagi penulis untuk penelitian dan penulisan karya ilmiah di masa yang akan datang.

Akhir kata, Penulis berharap tesis ini memberikan manfaat bagi kita semua terutama untuk pengembangan ilmu pengetahuan yang ramah lingkungan.

Semarang, Maret 2025

Penulis

Ayu Rizqi Nurul Iriani



ABSTRAK

Latar Belakang: *Inflammaging* ditandai dengan peningkatan stres oksidatif dan sitokin proinflamasi seperti TNF- α serta penurunan aktivitas antioksidan endogen. Ashwagandha (*Withania somnifera*) diketahui memiliki potensi antioksidan dan antiinflamasi. Penelitian ini bertujuan menganalisis pengaruh ekstrak akar Ashwagandha terhadap kadar GPx dan TNF- α pada tikus Wistar jantan model inflammaging.

Metode: Penelitian eksperimental *post-test only control group* menggunakan 24 ekor tikus Wistar jantan yang dibagi menjadi 4 kelompok: K1 (sehat), K2 (D-galaktosa + diet tinggi lemak), K3 (D-galaktosa + diet tinggi lemak + Ashwagandha 150 mg/kgBB/hari), dan K4 (D-galaktosa + diet tinggi lemak + Ashwagandha 300 mg/kgBB/hari). Perlakuan diberikan selama 28 hari, kemudian kadar GPx dan TNF- α diperiksa dengan metode ELISA.

Hasil: Kadar GPx tertinggi terdapat pada K2 ($27,87 \pm 1,35$ ng/L) dan terendah pada K1 ($15,73 \pm 2,07$ ng/L), dengan penurunan signifikan pada kelompok perlakuan Ashwagandha ($p < 0,001$). Kadar TNF- α tertinggi ditemukan pada K4 ($232,70 \pm 13,86$ ng/L) dan terendah pada K3 ($171,66 \pm 13,58$ ng/L). Analisis menunjukkan perbedaan bermakna antar kelompok ($p < 0,001$), dengan K3 tidak berbeda signifikan dari K1, sedangkan K4 meningkat signifikan dibanding kelompok lain.

Kesimpulan: Ekstrak akar Ashwagandha dosis 150 mg/kgBB/hari menurunkan kadar GPx dan TNF- α , menunjukkan efek protektif homeostasis terhadap *inflammaging*. Namun, pada dosis 300 mg/kgBB/hari justru meningkatkan TNF- α , mengindikasikan proses inflamasi yang lebih berat.

Kata kunci: Ashwagandha, *inflammaging*, GPx, TNF- α , ELISA.

ABSTRACT

Background: Inflammaging is characterized by increased oxidative stress and pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , along with decreased endogenous antioxidant activity. Ashwagandha (*Withania somnifera*) is known to possess antioxidant and anti-inflammatory properties. This study aimed to analyze the effect of Ashwagandha root extract on GPx and TNF- α levels in male Wistar rats with D-galactose and high-fat diet–induced inflammaging.

Methods: An experimental post-test only control group design was conducted using 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/day), and K4 (D-galactose + high-fat diet + Ashwagandha 300 mg/kgBW/day). Treatments were given for 28 days, followed by measurement of GPx and TNF- α levels using ELISA.

Results: The highest mean GPx level was found in K2 (27.87 ± 1.35 ng/L) and the lowest in K1 (15.73 ± 2.07 ng/L), with significant reduction observed in the Ashwagandha-treated groups ($p < 0.001$). TNF- α levels were highest in K4 (232.70 ± 13.86 ng/L) and lowest in K3 (171.66 ± 13.58 ng/L). Statistical analysis revealed significant differences among groups ($p < 0.001$), with K3 not differing from K1, while K4 showed a significant increase compared to all other groups.

Conclusion: Ashwagandha root extract at 150 mg/kgBW/day reduced GPx and TNF- α levels, indicating protective effects of homeostasis against inflammaging. However, the 300 mg/kgBW/day dose increased TNF- α level, suggesting a severe inflammatory process.

Keywords: Ashwagandha, inflammaging, GPx, TNF- α , ELISA.

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Ayu Rizqi Nurul Iriani
Tempat, Tanggal lahir : Demak, 8 Maret 1991
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Perempuan

B. Riwayat Pendidikan

RA Tarbiyatul Athfal : Lulus tahun 1996
SD N Buko 1 : Lulus tahun 2002
SMP N 1 Demak : Lulus tahun 2005
SMA N 1 Demak : Lulus tahun 2008
S1 FK Unissula : Lulus tahun 2012
Profesi Dokter Umum FK Unissula : Lulus tahun 2014
Magister Biomedik FK Unissula : Tahun 2024 - sekarang

C. Riwayat Keluarga

Nama Suami : Ari Sentani
Nama Anak : Ayunda Rizqi Mafaza
Azmi Rizqi Manendra

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
SURAT PERNYATAAN.....	iii
KATA PENGANTAR	iv
ABSTRAK	vii
<i>ABSTRACT</i>	viii
RIWAYAT HIDUP.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR SINGKATAN.....	xiv
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1. Tujuan Umum.....	3
1.3.2. Tujuan Khusus.....	3
1.4. Manfaat Penelitian.....	4
1.4.1. Manfaat Teoritis	4
1.4.2. Manfaat Praktis.....	4
1.5. Originalitas Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1. <i>Glutathione Peroxidase</i> (GPx)	8
2.1.1. Definisi.....	8
2.1.2. Biomolekuler.....	9

2.1.3. Peran GPx dalam Inflamasi.....	10
2.1.4. Hubungan GPx dengan Berbagai Penyakit.....	10
2.2. <i>Tumor Necrosis Factor-α</i> (TNF- α)	11
2.2.1. Definisi.....	11
2.2.2. Biomolekuler.....	12
2.2.3. Peran TNF- α dalam inflamasi	13
2.2.4. Hubungan TNF- α dengan Berbagai Penyakit	14
2.3. Penuaan.....	15
2.3.1. Definisi.....	15
2.3.2. Teori Penuaan.....	15
2.3.3 Diet Tinggi Lemak dan Penuaan.....	17
2.3.4 Induksi D-Galaktose dan Inflammaging	18
2.4. Stres Oksidatif dan Penuaan.....	19
2.4.1. Definisi Stres Oksidatif.....	19
2.4.2. Hubungan Antara Stres Oksidatif dan Penuaan	19
2.4.3. Kerusakan Oksidatif pada Molekul Biomolekuler.....	19
2.4.4. Mekanisme Antioksidan dalam Melawan Stres Oksidatif	20
2.4.5. Implikasi Klinis Stres Oksidatif dalam Penuaan.....	20
2.4.6. Strategi Mengurangi Stres Oksidatif.....	21
2.5. Inflamasi pada Penuaan (<i>Inflammaging</i>).....	21
2.5.1. Definisi.....	21
2.5.2. Mekanisme Dasar Inflammaging	22
2.5.3. Biomarker Inflammaging.....	23
2.5.4. Mekanisme GPx dan TNF- α dalam Penuaan	23
2.6. Ashwagandha sebagai Agen Antioksidan dan Anti-Inflamasi.	24
2.6.1. Komponen Bioaktif Ashwagandha	27

2.6.2. Aktivitas Antioksidan Ashwagandha.....	29
2.6.3. Aktivitas Antiinflamasi Ashwagandha	30
2.6.4. Aplikasi Klinis	31
2.6.5. Keamanan dan Toksisitas.....	31
2.7. Model Tikus.....	34
2.7.1. Karakteristik Tikus Sebagai Model Penuaan	34
2.7.2. Penggunaan Tikus dalam Penelitian Penuaan.....	35
2.7.3. Keunggulan Tikus sebagai Model Penuaan	36
2.7.4. Keterbatasan Tikus Sebagai Model Penuaan	37
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS	38
3.1. Kerangka Teori.....	38
3.2. Kerangka Konsep	43
3.3. Hipotesis	43
BAB IV METODE PENELITIAN	44
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	44
4.2. Populasi dan Sampel Penelitian.....	45
4.2.1. Populasi.....	45
4.2.2. Sampel.....	46
4.3. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	46
4.3.1. Variabel Bebas	46
4.3.2. Variabel Terikat	47
4.3.3. Definisi Operasional.....	47
4.4. Bahan dan Instrumen Penelitian.....	48
4.4.1. Bahan Penelitian.....	48
4.4.2. Instrumen untuk Perlakuan	48
4.5. Prosedur Penelitian.....	49

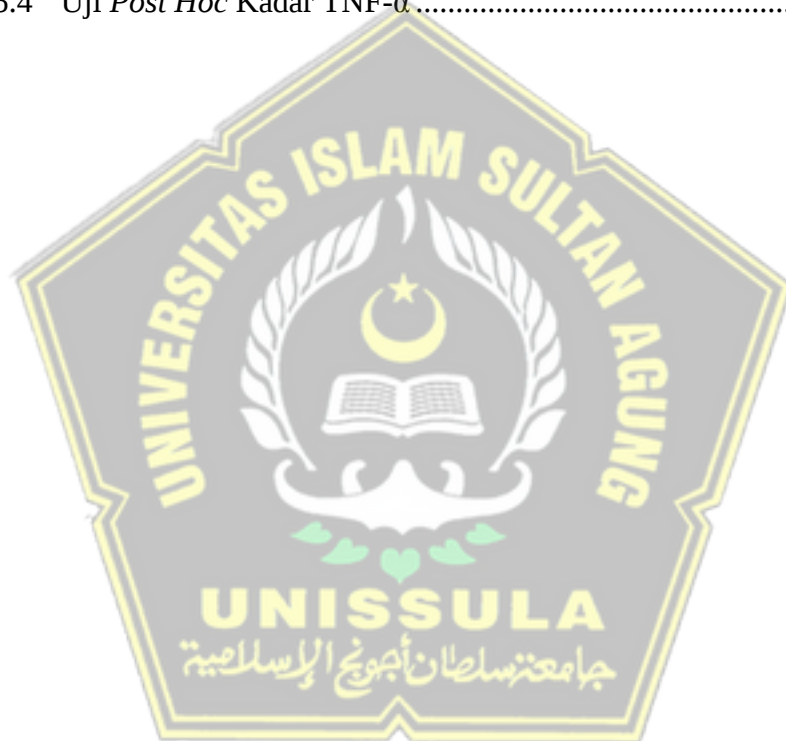
4.5.1. Perolahan <i>Ethical Clearance</i>	49
4.5.2. Pembuatan Suspensi CMC-Na 0,1%	49
4.5.3. Pembuatan Ekstrak Akar Ashwagandha	49
4.5.4. Perlakuan pada Hewan Coba	50
4.6. Tempat dan Waktu Penelitian	50
4.6.1. Tempat dan Waktu Penelitian	50
4.7. Alur Penelitian.....	51
4.8. Analisis Data	52
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	53
5.1 Hasil Penelitian.....	53
5.1.1 Pemeriksaan Kadar GPx pada Darah	54
5.1.2 Pemeriksaan Kadar TNF- α pada Darah	56
5.2 Pembahasan	59
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	66
6.1 Kesimpulan.....	66
6.2 Saran.....	67
DAFTAR PUSTAKA	68
LAMPIRAN.....	73
Lampiran 1. Surat Izin Penelitian.....	73
Lampiran 2. <i>Ethical Clearance</i>	74
Lampiran 3. CoA Ekstrak Ashwagandha.....	75
Lampiran 4. MSDS Ekstrak Ashwagandha	76
Lampiran 5. Dokumentasi Penelitian	77
Lampiran 6. Data Perubahan Berat Badan Tikus.....	79
Lampiran 7. Hasil Pemeriksaan Laboratorium	80
Lampiran 8. Output SPSS	81

DAFTAR SINGKATAN

ATP	: <i>Adenosine Triphosphate</i>
BPS	: <i>Badan Pusat Statistik</i>
CAT	: <i>Catalase</i>
COX-2	: <i>Cyclooxygenase-2</i>
COA	: <i>Certificate Of Analysis</i>
CR	: <i>Caloric Restriction</i>
CRISPR-Cas9	: <i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CRP	: <i>C-Reactif Protein</i>
DAMPs	: <i>Damage-Associated Molecular Patterns</i>
DM	: <i>Diabetes Mellitus</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ELISA	: <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FK	: <i>Fakultas Kedokteran</i>
GPx	: <i>Gluthatione Peroxidase</i>
H ₂ O ₂	: <i>Hidrogen Peroksida</i>
4-HNE	: <i>4-hydroxynonenal</i>
8-OHdG	: <i>8-hydroxydeoxyguanosine</i>
IDF	: <i>International Diabetes Federation</i>
IL-6	: <i>Interleukin-6</i>
IL-1 β	: <i>Interleukin-1β</i>
LDL	: <i>Low-Density Lipoprotein</i>
LOX	: <i>Lipoxygenase</i>
LPS	: <i>Lipopolisakarida</i>
LSD	: <i>Least Significant Differences</i>
MDA	: <i>Malondialdehyde</i>
MSDS	: <i>Material Safety Data Sheet</i>
mtDNA	: <i>DNA mitokondria</i>
NF- κ B	: <i>Nuclear Factor Kappa B</i>
NLRP3	: <i>NOD-, LRR-, and pyrin domain-containing protein 3</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SOD	: <i>Superoxide Dismutase</i>
SPSS	: <i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1	Originalitas Penelitian.....	5
Tabel 5.1	Kadar GPx pada Darah.....	55
Tabel 5.2	Uji <i>Post Hoc</i> Kadar GPx.....	56
Tabel 5.3	Kadar TNF- α pada Darah.....	57
Tabel 5.4	Uji <i>Post Hoc</i> Kadar TNF- α	58



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Efek Ashwaganadha	25
Gambar 4.1	Rancangan Penelitian	44
Gambar 4.2	Alur Penelitian.....	51
Gambar 5.1	Kadar GPx pada Darah.....	56
Gambar 5.2	Kadar TNF- α pada Darah.....	58



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Perubahan gaya hidup sedentari dan pola makan yang tidak seimbang menjadi tantangan paling mendesak di abad ke-21.^{1,2} Kemajuan teknologi di berbagai sektor menjadi pendorong utama budaya sedentari di masyarakat sehingga waktu yang dihabiskan untuk duduk dalam durasi panjang meningkat secara signifikan, sementara kesempatan untuk melakukan aktivitas fisik semakin berkurang.^{3,4} Kombinasi toksik dari asupan energi berlebih dan pengeluaran energi yang minim menjadi pondasi meningkatnya prevalensi penyakit degeneratif dan serangkaian kelainan metabolik yang berkaitan dengan *inflammaging*, serta terbukti meningkatkan stres oksidatif dan menurunkan kadar antioksidan dalam tubuh.^{3,4} *Inflammaging*, atau peradangan kronis tingkat rendah yang terkait dengan penuaan, adalah masalah kesehatan yang signifikan dan semakin banyak disoroti dalam dunia medis.^{2,4} Kondisi ini sebagai kontributor aktif terhadap berbagai penyakit degeneratif seperti penyakit kardiovaskular, neurodegeneratif, dan metabolik.³ Proses *inflammaging* ditandai dengan disregulasi jalur inflamasi dan stres oksidatif, yang mengakibatkan peningkatan produksi ROS dan sitokin pro-inflamasi.²⁻⁵ Meskipun mekanisme molekuler *inflammaging* sudah mulai dipahami, namun intervensi yang efektif untuk memitigasi proses ini masih terus diteliti. Salah satu pendekatan yang menjanjikan adalah

eksplorasi bahan alam dengan potensi antioksidan dan anti-inflamasi. Ashwagandha adalah tanaman obat Ayurveda yang memiliki sifat adaptogenik, anti-stres, dan anti-inflamasinya.⁵⁻⁷ Ashwagandha mengandung berbagai zat aktif utama seperti withanolides, alkaloid, flavonoid, fenolik, dan saponin.^{5,6} Senyawa ini dapat meningkatkan aktivitas enzim antioksidan tubuh, termasuk GPx yang berfungsi untuk memecah peroksida dan melindungi sel-sel dari kerusakan oksidatif.^{6,8,9} Senyawa tersebut juga dapat menurunkan kadar TNF- α sebagai sitokin pro-inflamasi.² Berbagai studi praklinis menunjukkan bahwa ekstrak Ashwagandha memiliki kemampuan untuk modulasi stres oksidatif dan respons inflamasi melalui berbagai jalur, akan tetapi penelitian yang secara spesifik mengkaji pengaruh ekstrak akar Ashwagandha terhadap indikator biokimia seperti GPx dan TNF- α dalam konteks *inflammaging* yang diinduksi pada model hewan, khususnya yang menyerupai kondisi penuaan masih terbatas sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut untuk menguji efek Ashwagandha terhadap *inflammaging*.⁶

GPx adalah salah satu enzim antioksidan endogen yang berperan dalam menetralkan ROS, sementara TNF- α adalah sitokin pro-inflamasi utama yang terlibat dalam respons imun dan peradangan.^{4,5} Pada kondisi *inflammaging*, aktivitas GPx seringkali menurun, sementara kadar TNF- α meningkat, sehingga mempercepat kerusakan seluler dan jaringan.⁶

Model tikus jantan galur Wistar yang diinduksi D-galaktose dan diet tinggi lemak merupakan model yang relevan untuk mensimulasikan kondisi *inflammaging*, karena D-galaktose diketahui mempercepat penuaan dan

memicu stres oksidatif, sementara diet tinggi lemak berkontribusi pada peradangan sistemik.⁶

Penelitian ini secara spesifik mengisi kesenjangan pengetahuan dengan mengevaluasi secara eksperimental pengaruh ekstrak akar Ashwagandha terhadap kadar GPx dan TNF- α pada model *inflammaging* hewan coba yang diinduksi D-galaktose dan diet tinggi lemak. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan bukti ilmiah yang lebih kuat mengenai potensi Ashwagandha sebagai agen terapeutik atau preventif dalam manajemen *inflammaging* dan penyakit terkait.⁸

1.2. Rumusan Masalah

Adakah pengaruh pemberian ekstrak akar Ashwagandha terhadap kadar GPx dan TNF- α pada tikus jantan galur wistar yang diinduksi D-Galaktose dan diet tinggi lemak?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Menganalisis pengaruh pemberian ekstrak akar Ashwagandha terhadap kadar GPx dan TNF- α pada tikus jantan galur wistar yang diinduksi D-Galaktose dan diet tinggi lemak.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Menganalisis pengaruh pemberian ekstrak akar Ashwagandha 150 mg/kgBB/hari dan 300 mg/kgBB/hari terhadap kadar GPx pada tikus jantan galur wistar yang diinduksi D-Galaktose dan diet tinggi lemak.

2. Menganalisis pengaruh pemberian ekstrak akar Ashwagandha 150 mg/kgBB/hari dan 300 mg/kgBB/hari terhadap kadar TNF- α pada tikus jantan galur wistar yang diinduksi D-Galaktose dan diet tinggi lemak.
3. Menganalisis perbedaan efek antar kelompok perlakuan terhadap kadar GPx dan TNF- α .

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Memberikan bukti ilmiah mengenai potensi antioksidan dan anti-inflamasi ekstrak akar Ashwagandha sebagai agen terapeutik pada *inflammaging*.

1.4.2. Manfaat Praktis

Mengembangkan pendekatan berbasis herbal Ashwagandha untuk meningkatkan kualitas hidup pada individu lanjut usia.

1.5. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian

No.	Peneliti	Judul Penelitian	Metode Penelitian	Hasil Penelitian
1.	Baghalpour, et al 2023 ¹⁰	<i>Antinociceptive, anti-inflammatory, and antioxidant studies on Withania somnifera (L.) Dunal</i>	Pengujian ekstraksi, identifikasi senyawa, serta pengujian aktivitas biologis melalui model hewan dan analisis laboratorium	W. somnifera dapat meningkatkan aktivitas enzim GPx dan perlindungan terhadap kerusakan sel yang disebabkan oleh stres oksidatif
2.	Sharma, et al 2020 ⁹	<i>The aqueous root extract of Withania somnifera ameliorates LPS-induced inflammatory changes in the in vitro cell-based and mice models of inflammation</i>	Pengujian dengan metode <i>in silico</i> (simulasi docking molekuler) dan <i>in vitro</i> (uji pada sel Vero E6) untuk menganalisis efek <i>Withania somnifera</i> terhadap SARS-CoV-2,	Ashwagandha dapat memulihkan keseimbangan enzimatik dan mengurangi stres oksidatif yang diinduksi oleh paparan gelombang mikro pada hewan coba.
3.	Singh, et al 2022 ¹¹	<i>Withania somnifera (L.) Dunal (Ashwagandha) for the possible therapeutics and clinical management of SARS-CoV-2 infection: Plant-based drug discovery and targeted therapy.</i>	Studi literatur berbasis <i>in silico</i> dan farmakologi molekuler untuk mengevaluasi potensi W. <i>somnifera</i> sebagai agen imunomodulator dan antivirus dalam penatalaksanaan COVID-19.	Senyawa withanone dalam ashwagandha berikatan kuat dengan protein spike virus (energi binding - 8.5 kkal/mol) serta menurunkan ekspresi TNF- α sebesar 40% dan meningkatkan aktivitas GPx 1,5 kali lipat pada sel yang terinfeksi
4.	Dutta, et al 2018 ¹²	<i>Protective effects of Withania somnifera extract in SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis</i>	Tikus diberi ekstrak <i>Withania somnifera</i> secara oral.	<i>Withania somnifera</i> memiliki peran penting dalam peningkatan aktivitas enzim

				antioksidan, SOD dan GPx, serta menurunkan ekspresi sitokin inflamasi, TNF- α dan IL-1 β
5.	Alanazi & Elyasa, 2023 ¹³	<i>The immunomodulatory role of withania somnifera (L.) dunal in inflammatory</i>	Studi literatur yang meninjau berbagai penelitian sebelumnya mengenai aktivitas imunomodulator dari Withania somnifera	Withania somnifera (Ashwagandha) memiliki peran imunomodulator yang efektif dalam mengobati berbagai penyakit, termasuk kondisi alergi dan inflamasi.

Semua penelitian di atas mengevaluasi kemampuan Ashwagandha untuk meningkatkan aktivitas antioksidan kadar GPx dan menurunkan sitokin pro-inflamasi TNF- α , menunjukkan konsistensi tujuan ilmiah. Studi tersebut melibatkan model hewan, khususnya tikus, 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 GPx dan TNF- α setelah pemberian ekstrak Ashwagandha. Hal ini mendukung hipotesis bahwa Ashwagandha memiliki potensi sebagai agen antioksidan dan antiinflamasi.

Penelitian ini secara spesifik mengkaji pengaruh ekstrak Ashwagandha terhadap kadar GPx dan TNF- α pada model tikus yang diinduksi D-galaktose dan diet tinggi lemak yang merupakan model stres oksidatif yang terkait dengan *inflammaging*. Penelitian ini berfokus pada kadar GPx dan TNF- α 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 mengaktivasi jalur inflamasi seperti NF- κ B. 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 terhadap kadar GPx dan TNF- α belum banyak dilakukan secara spesifik di Indonesia, sedangkan di negara lain, penelitian serupa telah menunjukkan hasil yang menjanjikan. Pada 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.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Glutathione Peroxidase (GPx)*

2.1.1. Definisi

Glutathione peroxidase (GPx) adalah enzim yang memiliki peran kunci dalam sistem pertahanan antioksidan tubuh. Enzim ini berfungsi untuk mengurangi peroksida, terutama H_2O_2 dan lipid peroksida, menjadi senyawa yang tidak berbahaya, seperti air atau alkohol, melalui reaksi reduksi yang melibatkan *glutathione* sebagai donor elektron. GPx adalah bagian dari keluarga enzim yang memiliki seleno-sistein pada situs aktifnya, yang memberikan aktivitas katalitik untuk reaksi peroksidasi.¹⁴

GPx dapat ditemukan dalam berbagai bentuk, baik yang terikat pada seluler maupun yang larut dalam plasma. Terdapat berbagai isoenzim GPx, seperti GPx1 yang berperan dalam sitosol, GPx2 yang ditemukan pada saluran pencernaan, dan GPx4 yang terkait dengan membran sel. Setiap isoenzim ini memiliki peran yang sangat penting dalam melindungi sel dari stres oksidatif di berbagai bagian tubuh.¹⁴

GPx bekerja beriringan dengan enzim antioksidan lain seperti SOD dan CAT, untuk mencegah akumulasi ROS dalam sel. Keberadaan GPx dalam sel sangat penting untuk mempertahankan keseimbangan redoks dan menjaga homeostasis seluler.¹⁴

2.1.2. Biomolekuler

GPx adalah enzim yang terdiri dari beberapa subunit protein yang mengandung selenium pada situs aktifnya, yang disebut seleno-sistein. Seleno-sistein merupakan asam amino yang mengandung selenium dan sangat penting dalam fungsi GPx karena kemampuannya untuk memberikan elektron pada molekul peroksida yang dihadapi. GPx memanfaatkan *glutathione* dalam prosesnya untuk mengubah peroksida menjadi senyawa yang lebih aman seperti air, menggunakan mekanisme redoks.¹⁴

GPx beroperasi dalam reaksi yang dikenal sebagai peroksidasi reduksi, di mana GPx mengkatalisis reaksi antara peroksida dan *glutathione*, menghasilkan produk akhir yang tidak berbahaya. Selama reaksi ini, dua molekul *glutathione* akan berinteraksi dengan peroksida untuk menghasilkan dua molekul *glutathione disulfide*. Setelah itu, akan direduksi kembali menjadi *glutathione* melalui aktivitas enzim *glutathione reductase*.¹⁴

Struktur GPx juga memungkinkan enzim ini bekerja secara efisien dalam seluler dan organel seperti mitokondria, di mana tingkat peroksida umumnya lebih tinggi. Meskipun enzim ini mengandung selenium, yang merupakan unsur trace, kehadirannya sangat penting dalam metabolisme tubuh, mengingat selenium adalah kofaktor yang tidak dapat disubstitusi oleh unsur lain.¹⁴

2.1.3. Peran GPx dalam Inflamasi

Salah satu peran utama GPx adalah menghambat stres oksidatif, yang dapat menyebabkan kerusakan oksidatif pada struktur molekul penting, seperti DNA, protein, dan membran lipid. Tanpa aktivitas GPx yang efektif, ROS akan mengakumulasi, meningkatkan risiko kerusakan sel, serta mempercepat penuaan dan disfungsi tubuh.¹⁴

GPx juga berperan dalam mempertahankan keseimbangan redoks selular. Keseimbangan antara produksi oksidan dan antioksidan diperlukan untuk mencegah kerusakan akibat radikal bebas dan stres oksidatif. Dengan mengurangi peroksida yang berlebihan, GPx berkontribusi merespon homeostasis redoks, yang merupakan faktor kunci dalam kesehatan jangka panjang.¹⁴

Secara klinis, kekurangan GPx dapat menyebabkan peningkatan kerentanannya terhadap penyakit degeneratif dan inflamasi. Misalnya, gangguan fungsi GPx dapat memperburuk penyakit kardiovaskular, kanker, penyakit neurodegeneratif, dan gangguan metabolik. Oleh karena itu, GPx tidak hanya penting untuk melawan stres oksidatif, tetapi juga untuk menjaga sistem kekebalan tubuh yang sehat dan mencegah berbagai penyakit kronis.¹⁴

2.1.4. Hubungan GPx dengan Berbagai Penyakit

GPx memiliki peran yang sangat penting dalam pencegahan berbagai penyakit kronis yang terkait dengan stres oksidatif. Penurunan aktivitas GPx berhubungan dengan peningkatan kerusakan oksidatif pada sel-sel tubuh, yang dapat memicu perkembangan

penyakit degeneratif seperti penyakit jantung koroner (PJK). Dalam kasus PJK, stres oksidatif berkontribusi pada pembentukan plak aterosklerotik di arteri, yang dapat menyebabkan penyumbatan aliran darah dan meningkatkan risiko serangan jantung.¹⁴

Kekurangan GPx telah ditemukan berhubungan dengan perkembangan penyakit neurodegeneratif, seperti Alzheimer dan Parkinson. Stres oksidatif yang berlebihan di otak dapat merusak sel-sel saraf, memperburuk inflamasi otak, dan menyebabkan disfungsi kognitif. GPx berfungsi melindungi neuron dari kerusakan yang disebabkan oleh peroksida, sehingga kekurangan aktivitas enzim ini dapat mempercepat perkembangan penyakit neurodegeneratif.¹⁴

Stres oksidatif dalam bidang kanker memainkan peran dalam proses karsinogenesis, yang melibatkan mutasi genetik akibat kerusakan DNA yang disebabkan oleh ROS. Penurunan aktivitas GPx dapat meningkatkan kerusakan DNA, yang berpotensi memicu pertumbuhan sel kanker. GPx berperan dalam pencegahan kanker dengan mengurangi tingkat ROS yang merusak DNA dan menyebabkan mutasi genetik.¹⁴

2.2. Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)

2.2.1. Definisi

Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) adalah sitokin proinflamasi yang diproduksi terutama oleh sel makrofag dan sel dendritik sebagai respons terhadap infeksi atau cedera. TNF- α berperan penting dalam

pengaturan reaksi imun dan inflamasi, serta berfungsi untuk memulai dan mengatur sistem pertahanan tubuh terhadap patogen. $\text{TNF-}\alpha$ dapat mempengaruhi berbagai sel tubuh, termasuk sel endotel, fibroblas, dan sel-sel imun lainnya, dengan memicu sekresi sitokin dan protein lainnya yang terlibat dalam inflamasi. Sebagai sitokin utama dalam respons imun tubuh, $\text{TNF-}\alpha$ diproduksi dalam jumlah besar selama fase akut dari respons peradangan, terutama pada infeksi bakteri dan virus. $\text{TNF-}\alpha$ juga dapat diproduksi oleh sel-sel seperti sel T, sel B, dan sel NK, yang berperan dalam mempertahankan pertahanan tubuh terhadap infeksi dan patogen. $\text{TNF-}\alpha$ bekerja dengan mengikat reseptor TNF pada permukaan sel target, yang kemudian menginduksi berbagai efek biologis yang beragam, termasuk peningkatan permeabilitas pembuluh darah dan aktivasi sistem kekebalan tubuh.¹⁵

2.2.2. Biomolekuler

$\text{TNF-}\alpha$ adalah sebuah protein kecil yang disintesis sebagai bentuk prekursor yang tidak aktif dan disebut sebagai pro- $\text{TNF-}\alpha$. Pro- $\text{TNF-}\alpha$ kemudian diproses oleh enzim $\text{TNF-}\alpha$, yang menghilangkan bagian transmembran dari molekul ini, menghasilkan bentuk aktif $\text{TNF-}\alpha$ yang dapat berfungsi dalam sistem biologis. $\text{TNF-}\alpha$ terdiri dari sekitar 157 asam amino dan dapat berfungsi sebagai homotrimer (tiga molekul $\text{TNF-}\alpha$ yang terikat bersama) dalam bentuk aktifnya.¹⁵

2.2.3. Peran TNF- α dalam inflamasi

TNF- α berfungsi sebagai mediator utama dalam respons inflamasi tubuh. Ketika tubuh mengalami infeksi atau cedera, TNF- α dilepaskan untuk merangsang sistem imun dan memulai proses peradangan. Fungsi utama TNF- α dalam peradangan adalah untuk meningkatkan permeabilitas pembuluh darah, yang memungkinkan sel-sel imun dan molekul protektif seperti antibodi dan faktor pembekuan darah untuk menuju lokasi infeksi atau cedera. Selain itu, TNF- α juga mengaktifkan makrofag dan neutrofil, dua jenis sel imun yang sangat penting dalam pertahanan tubuh terhadap patogen.¹⁵

TNF- α juga memainkan peran penting dalam pengaturan apoptosis, yaitu kematian sel terprogram. TNF- α berfungsi untuk menghilangkan sel-sel yang terinfeksi atau rusak, yang penting untuk menjaga keseimbangan homeostasis tubuh. Aktivasi jalur apoptosis oleh TNF- α juga dapat membantu dalam pengaturan pembelahan sel dan pencegahan pertumbuhan sel yang tidak terkendali, yang merupakan mekanisme penting dalam pencegahan kanker.¹⁵

TNF- α juga mempengaruhi metabolisme tubuh, di mana produksi TNF- α yang berlebihan dapat mengarah pada kondisi yang disebut sebagai cachexia, atau penurunan berat badan yang tidak dapat dijelaskan, yang sering terjadi pada pasien dengan kanker, infeksi kronis, atau penyakit peradangan lainnya. TNF- α berfungsi untuk mengatur energi tubuh dengan memengaruhi proses-proses metabolik di dalam hati, otot, dan jaringan adiposa.¹⁵

2.2.4. Hubungan TNF- α dengan Berbagai Penyakit

TNF- α memiliki peran yang sangat besar dalam sistem kekebalan tubuh, tetapi jika produksinya tidak terkontrol, TNF- α dapat menyebabkan berbagai penyakit. Dalam keadaan normal, TNF- α melindungi tubuh dari infeksi dengan memfasilitasi respon inflamasi dan mengaktifkan sel-sel imun untuk melawan patogen. Namun, ketika TNF- α diproduksi secara berlebihan atau terus-menerus, hal ini dapat berkontribusi pada perkembangan berbagai penyakit inflamasi kronis, seperti rheumatoid arthritis, penyakit Crohn, dan psoriasis.¹⁵

TNF- α memainkan peran kunci dalam patogenesis kanker. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa TNF- α dapat meningkatkan proliferasi sel kanker, terutama dalam jenis kanker yang melibatkan peradangan kronis, seperti kanker kolon atau kanker hati. Meskipun TNF- α memiliki kemampuan untuk menginduksi kematian sel pada sel-sel yang terinfeksi atau tumor, respons inflamasi yang berkepanjangan yang dipicu oleh TNF- α juga dapat mendukung lingkungan yang kondusif untuk pertumbuhan sel kanker dan metastasis.¹⁵

TNF- α juga berperan dalam penyakit neurodegeneratif seperti Alzheimer dan Parkinson, di mana peradangan kronis di otak dipicu oleh produksi TNF- α . Peningkatan kadar TNF- α di otak dapat merusak neuron dan memperburuk disfungsi kognitif. Dengan demikian, TNF- α tidak hanya terlibat dalam pertahanan tubuh

terhadap patogen, tetapi juga dapat menjadi mediator utama dalam kerusakan jaringan yang terkait dengan berbagai kondisi penyakit kronis.¹⁵

2.3. Penuaan

2.3.1. Definisi

Penuaan adalah proses biologis kompleks yang dialami oleh semua makhluk hidup. Proses ini ditandai oleh penurunan fungsi fisiologis yang terjadi secara bertahap seiring bertambahnya usia. Penuaan melibatkan berbagai mekanisme molekuler dan seluler, termasuk kerusakan DNA, stres oksidatif, disfungsi mitokondria, dan perubahan epigenetik.^{14,16}

2.3.2. Teori 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, mempengaruhi 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.¹⁵

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.¹⁷

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.

Seiring bertambah usia maka pola metilasi DNA berubah, mengakibatkan deregulasi gen yang berkontribusi pada penuaan. *Epigenetic clock* (misalnya, Horvath clock) digunakan untuk memprediksi usia biologis berdasarkan pola metilasi DNA.¹⁸

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 glutathion peroksidase. D-galaktosa mengaktifasi 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.^{1,19}

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 mempengaruhi 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-OHdG, yang menghambat replikasi DNA dan mempercepat apoptosis sel.¹⁷

2. Protein: ROS memicu oksidasi protein, mengubah struktur dan fungsi protein, sehingga berkontribusi pada penyakit degeneratif seperti Alzheimer dan Parkinson.²⁰
3. Lipid: Lipid peroksidasi oleh ROS menghasilkan produk toksik seperti MDA dan 4-HNE, yang merusak membran sel dan organel.¹⁹

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.¹⁹

Kemampuan sistem antioksidan ini menurun seiring bertambahnya usia, yang meningkatkan kerentanan terhadap stres oksidatif dan mempercepat penuaan.²¹

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.¹⁹

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.⁸ 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.²²
2. DM Tipe 2: Sitokin proinflamasi seperti TNF- α mengganggu jalur sinyal insulin, memicu resistensi insulin.²²
3. Neurodegenerasi: Inflamasi kronis di otak, terutama yang dimediasi oleh aktivasi mikroglia, berkontribusi pada patogenesis Alzheimer dan Parkinson.²¹

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

Proses penuaan menyebabkan mitokondria menghasilkan lebih banyak ROS sebagai produk sampingan metabolisme. ROS dapat merusak mtDNA dan memicu inflamasi melalui pelepasan DAMPs, seperti ATP dan protein mitokondria.¹⁵

3. Imunosenesens

Penuaan sistem imun (*immunosenescence*) menyebabkan perubahan pada komposisi sel imun, seperti penurunan fungsi

limfosit T dan peningkatan monosit proinflamasi. Kondisi ini berkontribusi pada lingkungan inflamasi kronis.²³

4. Peran Mikrobiota Usus

Penuaan memengaruhi komposisi mikrobiota usus, mengurangi keberadaan bakteri menguntungkan seperti *Bifidobacteria*. Perubahan ini dapat meningkatkan permeabilitas usus dan memungkinkan translokasi LPS, yang memicu respon inflamasi sistemik.²⁴

2.5.3. Biomarker Inflammaging

Beberapa biomarker telah diidentifikasi sebagai indikator *inflammaging*, antara lain:⁹

1. IL-6: Sitokin proinflamasi yang meningkat selama penuaan dan terkait dengan penyakit kardiovaskular serta mortalitas.
2. TNF- α : Dihubungkan dengan kerusakan jaringan dan resistensi insulin.

2.5.4. Mekanisme GPx dan TNF- α dalam Penuaan

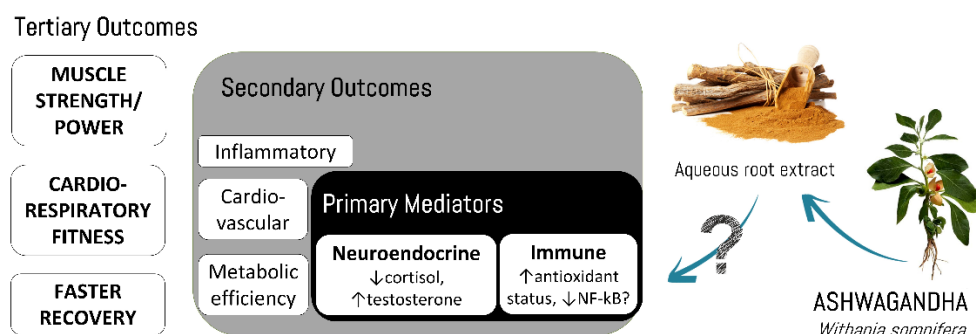
1. Inflamasi Kronis: Keduanya mempromosikan inflamasi kronis yang menyebabkan kerusakan kumulatif pada jaringan dan organ, mempercepat proses penuaan.⁹
2. Induksi Stres Oksidatif: TNF- α meningkatkan produksi ROS, sementara GPx mengindikasikan keberadaan stres oksidatif.⁸
3. Gangguan Regenerasi Seluler: terjadi karena disregulasi TNF- α dan GPx. Tingginya TNF- α memicu inflamasi kronis yang

menghambat proses perbaikan dan regenerasi jaringan, sementara GPx adalah antioksidan yang mendukung regenerasi.²

GPx dan TNF- α adalah mediator inflamasi utama dalam penuaan. Peningkatan kronis keduanya menginduksi stres oksidatif, inflamasi, dan disfungsi metabolik yang berkontribusi pada perubahan degeneratif khas penuaan. Dengan memahami peran GPx dan TNF- α , pendekatan baru untuk memperlambat penuaan dan meningkatkan kualitas hidup dapat dikembangkan.⁹

2.6. Ashwagandha sebagai Agen Antioksidan dan Anti-Inflamasi

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 sering digunakan karena kandungan senyawa aktif utamanya adalah withanolides dan mengandung konsentrasi tertinggi bila dibandingkan dengan bagian tanaman lainnya sehingga sampai saat ini masih digunakan sebagai golden standart untuk pengobatan berbasis herbal.⁵² 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.⁷



Gambar 2.1 Efek Ashwaganadha²⁵

Mekanisme kerja Ashwagandha dalam tubuh manusia dapat dijelaskan secara bertingkat, dimulai dari pengaruhnya terhadap regulator molekuler hingga tercapainya manfaat fisiologis yang dapat diobservasi secara klinis. Ekstrak akar Ashwagandha, khususnya dalam bentuk aqueous root extract, menunjukkan berbagai efek biologis yang dimediasi melalui jalur neuroendokrin dan imunologis.²⁵

Pada tingkat mediator primer, ekstrak akar Ashwagandha menyebabkan penurunan kadar hormon kortisol, yaitu hormon utama yang dilepaskan dalam respon stres melalui aktivasi sumbu hipotalamus–hipofisis–adrenal (HPA axis). Penurunan kortisol disertai dengan peningkatan kadar testosteron, yang memainkan peran penting dalam regulasi metabolisme, fungsi muskular, dan regenerasi jaringan. Bersamaan dengan perubahan hormonal tersebut, terjadi pula peningkatan aktivitas sistem antioksidan endogen dan penurunan aktivitas jalur inflamasi NF-κB. Jalur ini diketahui mengatur transkripsi berbagai mediator inflamasi, termasuk IL-6, TNF-α, dan COX-2, yang memiliki kontribusi penting dalam patogenesis penyakit kronik degeneratif.²⁵

Pengaruh pada mediator primer tersebut menghasilkan efek sistemik tingkat menengah, meliputi perbaikan fungsi kardiovaskular, penurunan inflamasi sistemik, serta peningkatan efisiensi metabolik. Peningkatan efisiensi metabolik tersebut antara lain ditandai dengan sensitivitas insulin yang lebih baik, perbaikan profil lipid, dan penurunan akumulasi ROS dalam jaringan perifer. Efek fisiologis akhir atau *tertiary outcomes* dari konsumsi ekstrak akar Ashwagandha meliputi peningkatan kekuatan dan daya tahan otot, peningkatan kapasitas kardiorespirasi, serta percepatan pemulihan pasca aktivitas fisik atau stres metabolik. Hal ini menjadikan Ashwagandha sebagai salah satu agen alami yang menjanjikan dalam pendekatan integratif terhadap gangguan metabolik, inflamasi kronik, dan proses penuaan.²⁵

Dibandingkan tanaman herbal lain seperti *Curcuma longa* (kunyit) atau *Ginkgo biloba*, ashwagandha menawarkan efek holistik karena tidak hanya mengurangi stres oksidatif dan inflamasi, tetapi juga meningkatkan ketahanan sel melalui mekanisme adaptogenik, seperti modulasi kortisol dan peningkatan fungsi mitokondria. Keunggulan ashwagandha semakin terlihat dalam kemampuannya untuk melindungi sistem saraf, suatu aspek kritis dalam penyakit neurodegeneratif. Berbeda dengan herbal lain seperti *Panax ginseng* atau *Bacopa monnieri* yang lebih fokus pada peningkatan kognitif, ashwagandha secara simultan mengurangi akumulasi beta-amiloid (pada Alzheimer) dan mencegah apoptosis neuronal melalui regulasi protein Bcl-2 dan Bax. Selain itu, ashwagandha menunjukkan efek sinergis dalam kombinasi dengan herbal lain, seperti meningkatkan bioavailabilitas

kurkumin dari kunyit. Kelebihan lain adalah profil keamanannya yang baik, dengan efek samping minimal dibandingkan tanaman herbal yang berpotensi hepatotoksik (misalnya *Polygala tenuifolia*). Dengan demikian, ashwagandha tidak hanya unggul dalam menangani stres oksidatif dan inflamasi, tetapi juga memberikan manfaat multifaset dalam memperlambat progresi penyakit degeneratif terkait usia.^{7,25}

2.6.1. Komponen Bioaktif Ashwagandha

Berbagai senyawa bioaktif dalam Ashwagandha berkontribusi pada sifat terapeutiknya.²⁵

1. Withanolides: Kelompok withanolides, khususnya withaferin A dan withanolide D, merupakan senyawa steroidal lakton yang paling dominan ditemukan dalam akar Ashwagandha. Withaferin A diketahui memiliki aktivitas antiinflamasi melalui penghambatan jalur pensinyalan nuklir faktor kappa B (NF- κ B), yang merupakan regulator transkripsi utama dari berbagai gen proinflamasi. Senyawa ini juga mampu menekan ekspresi enzim siklooksigenase-2 (COX-2) dan nitric oxide synthase (iNOS), serta berperan dalam induksi apoptosis pada sel yang mengalami kerusakan oksidatif atau transformasi maligna. Withanolide D turut berkontribusi dalam mempertahankan integritas membran sel dan memberikan perlindungan terhadap kerusakan jaringan akibat proses inflamasi kronis. Selain withanolida, akar Ashwagandha juga mengandung sitoindosida, yang merupakan derivat glikosida dari withanolida. Sitoindosida VII hingga X

telah terbukti secara eksperimental meningkatkan aktivitas enzim-enzim antioksidan endogen seperti superoxide dismutase (SOD), katalase, dan glutathione peroksidase (GPx), serta menurunkan kadar malondialdehida (MDA), yang merupakan produk akhir peroksidasi lipid dan penanda stres oksidatif.

2. Alkaloid: Kandungan alkaloid seperti somniferin dan anaferin memberikan efek sedatif ringan, serta mendukung kestabilan fungsi sistem saraf pusat.
3. Flavonoid dan Tannin: Komponen flavonoid dan senyawa fenolik yang terdapat dalam akar, seperti quercetin dan asam klorogenat, berperan sebagai penangkal radikal bebas (free radical scavenger), yang bekerja dengan cara menstabilkan spesies oksigen reaktif (ROS) dan mencegah kerusakan biomolekul penting seperti DNA, protein, dan lipid membran.
4. Saponin: Saponin dikenal memiliki aktivitas imunostimulan, antiinflamasi, dan antimikroba. Dalam konteks imunomodulasi, saponin dapat meningkatkan respon imun nonspesifik, termasuk aktivasi fagosit dan peningkatan produksi sitokin antiinflamasi. Selain itu, saponin berperan dalam menstabilkan membran sel, serta memiliki efek hipokolesterolemik, yang bermanfaat dalam menurunkan kadar kolesterol serum melalui peningkatan ekskresi asam empedu.
5. Fitosterol dan withanone: Komponen fitosterol, seperti β -sitosterol, turut berkontribusi dalam aktivitas antiinflamasi dan

kardioprotektif melalui modulasi kadar kolesterol serta efek stabilisasi membran. Senyawa withanone, yang juga ditemukan dalam akar, memiliki aktivitas protektif terhadap sel normal serta menunjukkan selektivitas sitotoksik terhadap sel abnormal. Selain itu, akar Ashwagandha mengandung sejumlah mineral, termasuk besi (Fe), dan asam amino seperti triptofan, yang relevan dalam sintesis serotonin serta fungsi metabolik lainnya.

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 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.²⁶

3. Perlindungan DNA

Studi menunjukkan bahwa *Withania somnifera* melindungi DNA dari kerusakan oksidatif, terutama terhadap serangan radikal bebas.²⁶

2.6.3. Aktivitas Antiinflamasi 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 COX-2. *Withania somnifera* 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.¹¹

3. Inhibisi COX dan LOX

Ekstrak Ashwagandha menghambat aktivitas COX dan LOX, yang merupakan enzim utama dalam jalur inflamasi.²⁷

4. Efek pada Inflamasi Kronis

Withania somnifera telah terbukti efektif dalam model hewan dengan penyakit inflamasi kronis, seperti artritis reumatoid, dengan menekan peradangan pada jaringan sendi.²⁷

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.²⁸
2. Penyakit Kardiovaskular: Sifat antioksidan membantu mencegah aterosklerosis dengan mengurangi peroksidasi lipid.²⁶
3. Diabetes: Efek anti-inflamasi dan antioksidan mendukung perlindungan terhadap komplikasi diabetes.²⁸
4. Kanker: Ashwagandha menghambat proliferasi sel kanker melalui efek imunomodulasi dan anti-inflamasi.²⁶

2.6.5. Keamanan dan Toksisitas

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.²⁹

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.²⁶

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.²⁷

Pada 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. Penelitian yang dilakukan 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 Audy 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.²⁷

Beberapa 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.²⁷

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.²⁷

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.²⁷

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.²⁷

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 serta meningkatkan enzim antioksidan, walaupun secara spesifik belum banyak yang

menilai kadar GPx dan TNF- α yang diinduksi D-galaktose dan diet tinggi lemak secara bersamaan.²⁷

2.7. Model Tikus

Tikus 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.³⁰

2.7.1. Karakteristik Tikus Sebagai Model Penuaan

Tikus memiliki beberapa karakteristik yang menjadikannya ideal sebagai model penuaan:³⁰

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.¹⁷
- b. Penurunan Fungsi Imun: Tikus tua mengalami immunosenescence, termasuk penurunan fungsi limfosit T dan peningkatan inflamasi sistemik (*inflammaging*).²³
- c. Stres Oksidatif: Studi menunjukkan bahwa tikus tua memiliki kadar ROS yang lebih tinggi dan kapasitas antioksidan yang menurun dibandingkan tikus muda.²²

2. Model Penyakit Degeneratif

Tikus sering digunakan untuk mempelajari penyakit yang berkaitan dengan penuaan, seperti:⁸

- 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:¹⁷

- a. Restriksi Kalori (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.

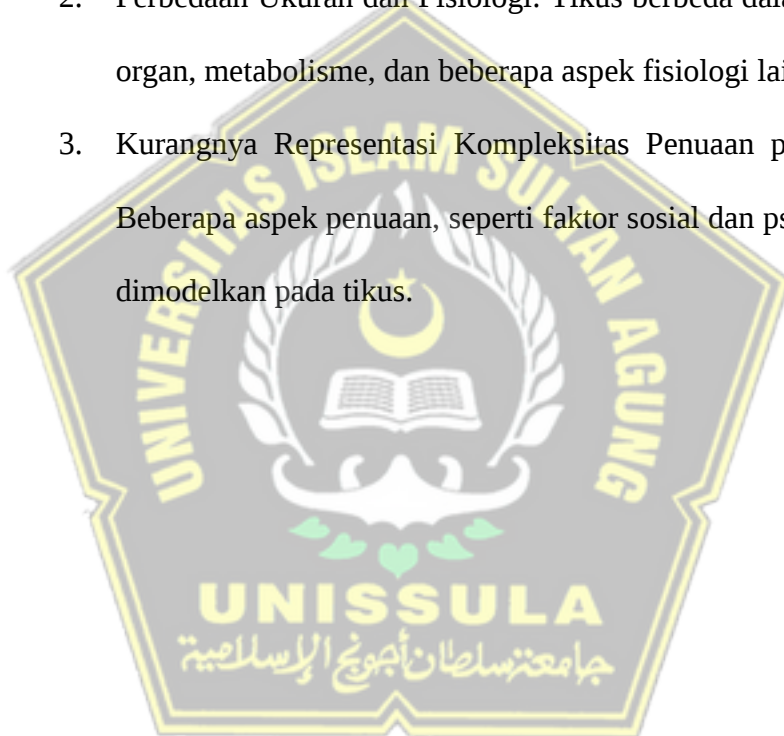
2.7.3. Keunggulan Tikus sebagai Model Penuaan

1. Reproduksi Cepat: Tikus berkembang biak dengan cepat, memungkinkan studi multigenerasi.¹⁸
2. Variasi Genetik: Tersedia berbagai strain tikus dengan karakteristik genetik tertentu, seperti tikus *Sprague-Dawley* dan *Wistar*, yang sering digunakan dalam penelitian penuaan.¹⁰
3. Manipulasi Genetik: Teknologi seperti *CRISPR-Cas9* memungkinkan modifikasi gen untuk mempelajari gen spesifik yang terlibat dalam penuaan.¹⁷

2.7.4. Keterbatasan Tikus Sebagai Model Penuaan

Meskipun tikus adalah model yang kuat, mereka memiliki beberapa keterbatasan:¹⁷

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

Induksi D-galaktose dapat memberikan efek penuaan melalui mekanisme peningkatan stres oksidatif melalui regulasi NF- κ B memicu sitokin pro-inflamasi inflamasi seperti IL-1 β , IL-6, dan TNF- α .⁶

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-enzimatis. 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 (H₂O₂) pada jalur oksidasi, yang dapat menurunkan kadar SOD dan selanjutnya akan meningkatkan ROS dan dapat merusak struktur sel.³¹

D-galaktosa juga mengalami reaksi glikasi non-enzimatis, 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.³¹

Konsumsi diet tinggi lemak dikaitkan dengan berbagai masalah kesehatan seperti obesitas dan penyakit kardiovaskular.³² Diet tinggi lemak dapat memicu serangkaian aktivasi ROS dan proses inflamasi yang dapat menyebabkan kerusakan pada komponen seluler, termasuk lipid pada membran sel, protein, dan DNA sehingga memicu aktivasi enzim antioksidan GPx.³² Diet tinggi lemak dapat mengaktivasi ROS melalui regulasi NF- κ B memicu pelepasan sitokin pro-inflamasi TNF- α .³² Diet tinggi lemak juga dapat menyebabkan perubahan mikrobiota dalam usus.³³ Bakteri *Lactobacillus sakei* memiliki mekanisme pertahanan antioksidan yang kuat sehingga bakteri yang rentan terhadap stres oksidatif akan berkurang jumlahnya, sementara bakteri yang resisten seperti *L. sakei* mendapatkan keuntungan kompetitif dan dapat berkembang biak tanpa banyak saingan.³³ Peningkatan signifikan satu jenis bakteri secara dominan merupakan salah satu bentuk disbiosis (ketidakseimbangan mikrobiota usus) yang dapat ditemukan pada individu obesitas yang mengonsumsi diet tinggi lemak.³³ Peningkatan ini menjadi biomarker kerusakan permeabilitas usus sehingga mengaktifkan jalur sinyal *Toll-like receptor 4* (TLR4) sebagai penghubung krusial antara mikrobiota yang berubah dan respons peradangan sistemik.^{33,34} Meningkatnya populasi bakteri Gram-negatif dapat meningkatkan konsentrasi LPS di dalam usus.³⁴ Kombinasi dari peningkatan LPS dan usus yang bocor memungkinkan LPS untuk berpindah dari usus ke dalam aliran darah.³⁴ Aktivasi jalur TLR4 ini mengarah pada produksi dan pelepasan sitokin pro-inflamasi (seperti TNF- α dan IL-6), yang menyebabkan proses inflamasi kronis di seluruh tubuh, termasuk di jaringan lemak.³⁴

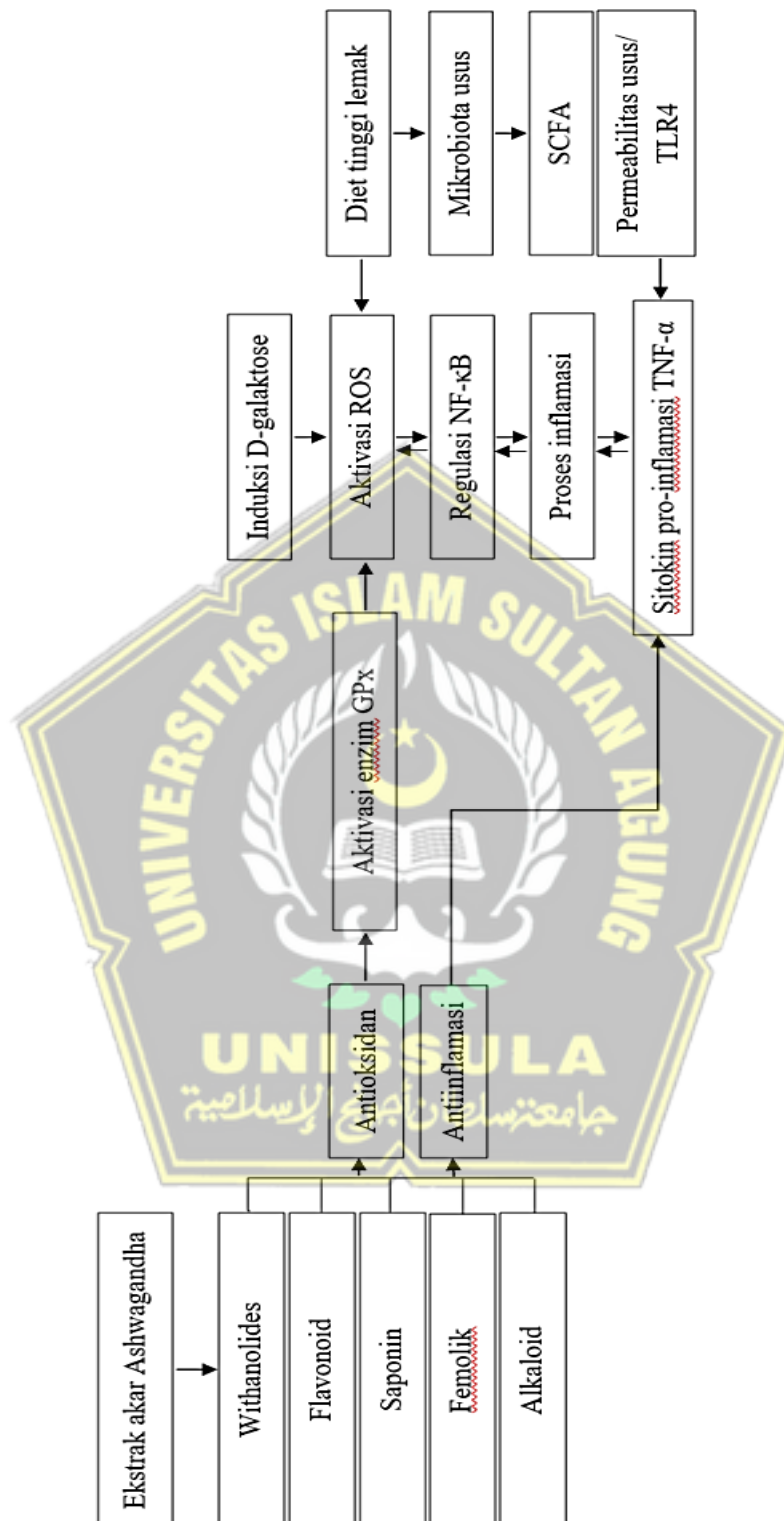
Penuaan adalah proses biologis yang melibatkan perubahan degeneratif progresif pada sel, jaringan, dan organ yang mengarah pada penurunan fungsi fisiologis.⁵ Mekanisme penuaan melibatkan ketidakseimbangan antara produksi ROS dan kapasitas antioksidan tubuh, menyebabkan kerusakan biomolekuler seperti DNA, protein, dan lipid. Efek pada penuaan berupa peningkatan ROS menyebabkan kerusakan DNA, lipid, dan protein, serta mempercepat proses apoptosis dan disfungsi mitokondria.³ Inflamasi kronis tingkat rendah atau *inflammaging* yang berkembang seiring bertambahnya usia, ditandai dengan peningkatan sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α . Mekanismenya adalah melalui aktivasi jalur NF- κ B memicu pelepasan sitokin proinflamasi seperti TNF- α , yang selanjutnya memperburuk kondisi inflamasi dan disfungsi imun (*immunosenescens*) meningkatkan pada individu yang menua.⁶

Salah satu upaya untuk mengurangi efek penuaan adalah dengan menggunakan bahan alami seperti ekstrak akar Ashwagandha. Tanaman ini mengandung withanolides, alkaloid, saponin, flavonoid, dan fenolik yang memiliki aktivitas antioksidan dan anti-inflamasi. Aktivitas antioksidan dari tanaman ini meningkatkan ekspresi enzim antioksidan seperti SOD, CAT, dan GPx, serta melindungi DNA dan lipid dari kerusakan oksidatif yang dapat mempercepat penuaan.¹¹

Ekstrak akar Ashwagandha juga memiliki aktivitas antiinflamasi yang bekerja dengan menghambat jalur NF- κ B. Menurunkan tingkat sitokin proinflamasi seperti IL-1 β , IL-6, dan TNF- α membantu mengurangi inflamasi

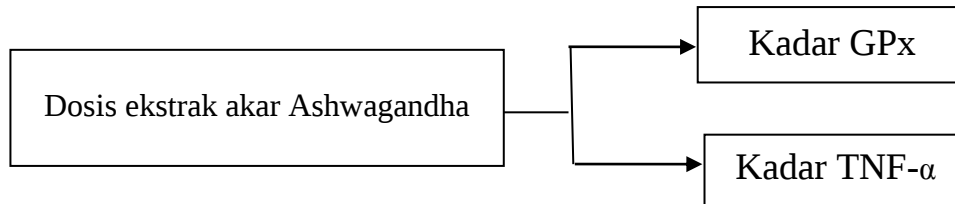
sistemik yang berhubungan dengan berbagai penyakit kronis. Penurunan inflamasi ini dapat mengurangi kerusakan pada organ dan jaringan tubuh yang terkait dengan penuaan, memperlambat proses penuaan, dan memperbaiki kondisi fisiologis secara keseluruhan.¹¹





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 GPx dan TNF- α pada tikus jantan galur wistar yang diinduksi D-Galaktose dan diet tinggi lemak.

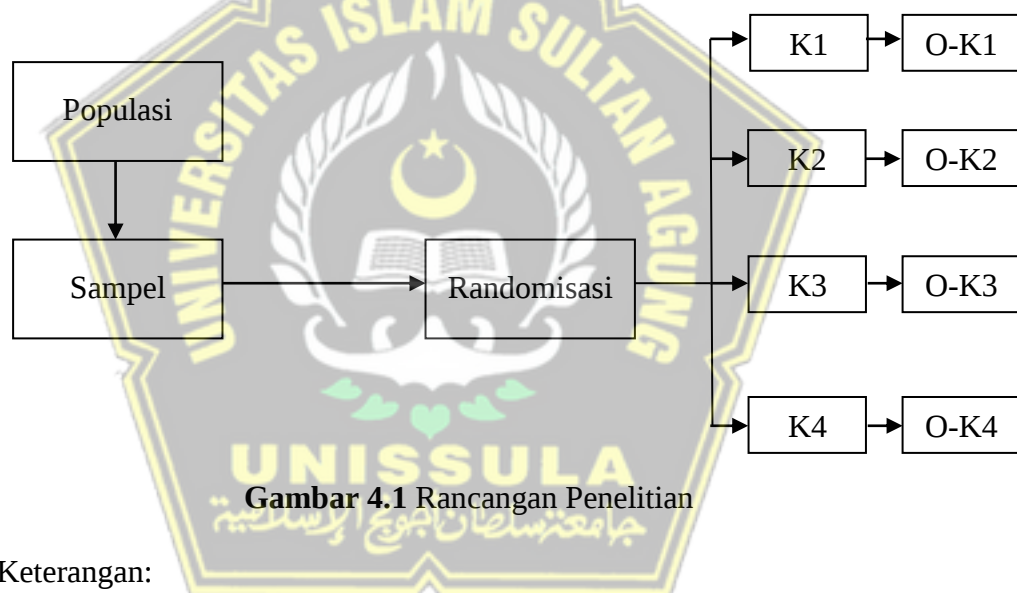


BAB IV

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 Jantan galur wistar.



Keterangan:

- K1 (Kelompok tikus sehat tanpa perlakuan)
- K2 (Kelompok kontrol negatif yakni tikus yang diinduksi D-Galaktose dan diet tinggi lemak dengan pemberian CMC 0,1%)
- K3 (Kelompok yang diinduksi D-Galaktose dan diet tinggi lemak yang mendapat perlakuan pemberian ekstrak akar Ashwagandha 150 mg/KgBB/hari)

K4 (Kelompok yang diinduksi D-Galaktose dan diet tinggi lemak yang mendapat perlakuan pemberian ekstrak akar Ashwagandha 300 mg/kgBB/hari)

O-K1 : Observasi/pengukuran kadar GPx dan TNF- α pada kelompok K1

O-K2 : Observasi/pengukuran kadar GPx dan TNF- α pada kelompok K2

O-K3 : Observasi/pengukuran kadar GPx dan TNF- α pada kelompok K3

O-K4 : Observasi/pengukuran kadar GPx dan TNF- α pada kelompok K4

4.2. Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1. Populasi

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus jantan galur wistar yang diperoleh dari Laboratorium IBL FK Unissula. Adapun kriteria inklusi sampel adalah sebagai berikut:

1. Tikus jantan galur wistar
2. Usia sekitar 2 bulan
3. Berat badan tikus sekitar 200-250 gram
4. Tikus dalam kondisi sehat
5. Tikus dipelihara dalam lingkungan terkontrol (suhu, kelembaban, pencahayaan, dan siklus siang-malam).

Adapun kriteria drop out adalah sebagai berikut:

1. Tikus yang mati dan sakit saat dilakukan penelitian.

4.2.2. Sampel

Teknik pengambilan sampel penelitian ini menggunakan cara *simple random sampling* setelah tikus memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Jumlah sampel dihitung menggunakan rumus Federer's, yaitu $(n - 1)(t-1) \geq 15$, 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 dari 6. Dengan demikian, total tikus yang digunakan adalah 24 ekor.

Tikus yang digunakan pada penelitian ini 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 menjadi 4 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor tikus dan menerima perlakuan yang berbeda sesuai desain eksperimen, serta masing-masing kelompok akan ditambahkan 1 tikus cadangan.

4.3. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.3.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak akar Ashwagandha.

4.3.2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas kadar GPx dan TNF- α .

4.3.3. Definisi Operasional

1. Dosis ekstrak akar Ashwagandha yang digunakan sebesar 150 dan 300 mg/KgBB/hari. Ekstrak akar Ashwagandha yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari PT Mensa Binasukses, Pulogadung.

- Dosis ekstrak akar Ashwagandha 150 mg/KgBB/hari

$$0,15 \text{ gr} \times 200 \text{ gr} = 30 \text{ gr/hari}$$

$$0,15 \text{ gr} \times 200 \text{ gr} \times 28 \text{ hari} = 840 \text{ gr}$$

- Dosis ekstrak akar Ashwagandha 300 mg/KgBB/hari

$$0,30 \text{ gr} \times 200 \text{ gr} = 60 \text{ gr/hari}$$

$$0,30 \text{ gr} \times 200 \text{ gr} \times 28 \text{ hari} = 1.680 \text{ gr}$$

Ekstrak akar Ashwagandha diberikan secara oral dengan menggunakan sonde dalam suspensi CMC-Na (*Natrium Carboxymethyl Cellulose*) 0,1% selama 28 hari. Diukur dengan skala ordinal.

2. Kadar GPx. Pengukuran kadar GPx dilakukan pada hari ke-29 dengan metode ELISA menggunakan sampel plasma darah vena orbital tikus untuk mengetahui kapasitas antioksidan. 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 U/mL dengan skala rasio.

3. Kadar TNF- α . Pengukuran kadar TNF- α dilakukan dilakukan pada hari ke-29 dengan metode ELISA menggunakan sampel plasma darah vena orbital tikus 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. Ekstrak akar Ashwagandha
2. Suspensi CMC-Na (*Natrium Carboxymethyl Cellulose*) 0,1%
3. Aquades

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 Antio ksidan: Kit komersial untuk analisis aktivitas GPx sesuai protokol.
4. ELISA Reader: Untuk analisis kadar sitokin proinflamasi (TNF- α) 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 agar presisi.

4.5. Prosedur Penelitian

4.5.1. Perolahan *Ethical Clearance*

Permohonan *ethical clearance* diajukan kepada Komisi Etik. Penelitian FK Unissula Semarang. Persetujuan *ethical clearance* menjadi syarat utama sebelum penelitian ini dilaksanakan.

4.5.2. Pembuatan Suspensi CMC-Na 0,1%

CMC-Na adalah turunan selulosa yang larut dalam air dan digunakan sebagai pengental/ peningkat viskositas, pengemulsi dan penstabil, pengikat, pembentuk gel, dan agen suspending. Senyawa ini berbentuk bubuk atau granul yang tidak beracun, bersifat *biodegradable*, dan dapat membentuk larutan koloidal yang stabil.

CMC-Na 0,1 gr dilarutkan dalam 100 ml aquades hangat (suhu 40-50°C) hingga homogen.

4.5.3. Pembuatan Ekstrak Akar Ashwagandha

Ekstrak akar Ashwagandha dilengkapi dengan sertifikasi yang menjamin aspek keamanan dalam penggunaannya, serta memastikan kualitas, kemurnian, dan efektivitas bahan aktif. Bahan baku ini menggunakan standar kualitas yang ketat, keefektifan bahan tetap terjaga, sehingga mendukung validitas hasil penelitian secara optimal.

4.5.4. Perlakuan pada Hewan Coba

Tikus dipelihara dalam kandang standar dengan pakan dan air minum ad libitum. Pakan yang diberikan merupakan pakan padat yang mengandung diet tinggi lemak. Pakan akan diberikan sebanyak 100 gram dan dari 100 gram tersebut 60% total kalori berasal dari lemak. Pakan diberikan dalam bentuk pellet padat dengan konsumsi rata-rata 20–25 gram per hari per ekor setara dengan ± 7 gram lemak per hari. Pakan akan diberikan secara oral selama 4 minggu. Tikus diadaptasi selama 7 hari sebelum perlakuan dimulai.

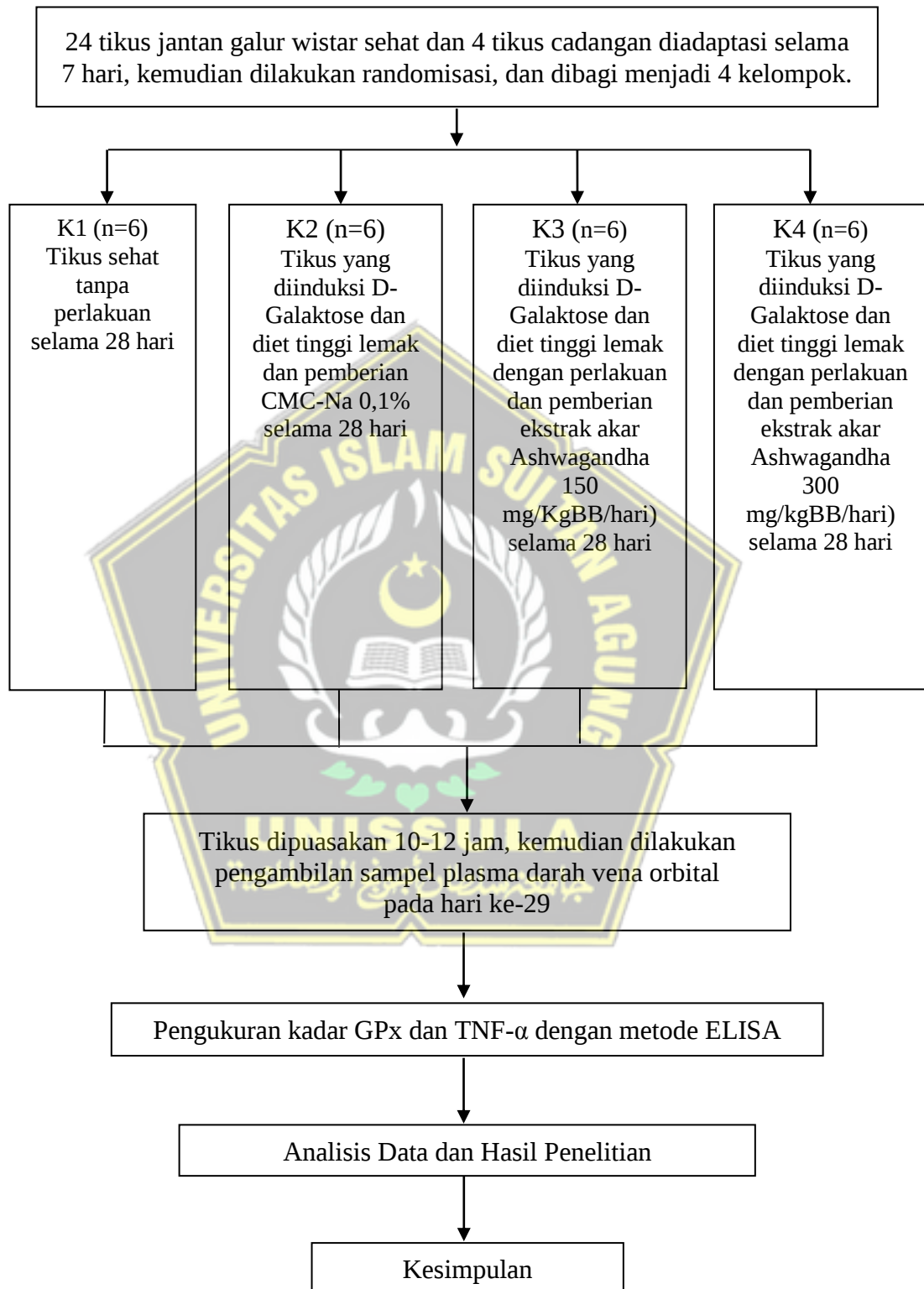
Tikus akan diinduksi D-Galactose cair dengan dosis 300 mg/kgBB (0.75 ml) setiap hari melalui sonde dengan kombinasi makanan tinggi lemak (60% energi yang dibutuhkan tikus atau 2 gram lemak per hari) yang diberikan melalui pellet selama 28 hari. Induksi akan dilakukan selama 28 hari sehingga terjadi *inflammaging*. Induksi kemudian akan tetap diikuti perjalanan intervensi dari hari ke-1 hingga hari ke-28.

4.6. Tempat dan Waktu Penelitian

4.6.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Pengambilan sampel penelitian dilakukan di Laboratorium IBL FK Universitas Islam Sultan Agung Semarang (UNISSULA) pada bulan Desember 2024 – September 2025.

4.7. Alur Penelitian



Gambar 4.2 Alur Penelitian

4.8. Analisis Data

Data hasil penelitian merupakan data rasio sehingga yang perlu dilakukan pertama kali adalah uji normalitas dan homogenitas. Uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas menggunakan uji *Levene*. Data terdistribusi normal dan homogen maka dianalisis dengan uji *one-way Anova* dan dilanjutkan uji *post hoc* LSD untuk mengetahui perbedaan antar kelompok. Keputusan menolak atau menerima hipotesis berdasarkan alpha 5%. Pengolahan data menggunakan Software Statistik SPSS seri 27 dan menggunakan Microsoft Excel untuk pengelolaan data awal.



BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk menilai pengaruh ekstrak akar Ashwagandha (*Withania somnifera*) terhadap kadar *Glutathione Peroxidase* (GPx) dan *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF- α) pada model inflamaging yang diinduksi dengan D-galaktosa dan diet tinggi lemak pada tikus Wistar jantan. Total 24 ekor tikus Wistar jantan sehat digunakan dalam penelitian ini. Sebelum perlakuan, hewan uji diadaptasi terlebih dahulu selama tujuh hari untuk menyesuaikan diri dengan kondisi lingkungan penelitian. Setelah periode adaptasi, tikus dibagi ke dalam empat kelompok perlakuan. Kelompok K1 merupakan kelompok sehat tanpa induksi maupun perlakuan, yang dipelihara selama 28 hari. Kelompok K2 sebagai kontrol negatif, yaitu tikus yang diinduksi D-galaktosa dan diberi diet tinggi lemak, serta mendapat *Carboxymethylcellulose* (CMC-Na) 0,1% selama 28 hari. Kelompok K3 juga diinduksi dengan D-galaktosa dan diet tinggi lemak, kemudian diberikan ekstrak akar Ashwagandha dosis 150 mg/kgBB selama 28 hari. Sementara itu, kelompok K4 memperoleh perlakuan serupa dengan K3, tetapi dengan dosis ekstrak akar Ashwagandha 300 mg/kgBB selama 28 hari.

Setelah perlakuan selesai, sampel darah diambil dari semua tikus untuk pemeriksaan kadar GPx dan TNF- α menggunakan metode ELISA. Selanjutnya, data dianalisis untuk mengetahui efek pemberian ekstrak akar

Ashwagandha terhadap biomarker stres oksidatif dan inflamasi pada model inflamaging. Validasi tidak dilakukan pada penelitian ini karena rancangan yang digunakan adalah *post-test only control group design*. Induksi D-galaktosa yang dikombinasikan dengan diet tinggi lemak telah banyak digunakan dalam model penelitian penuaan buatan, karena keduanya dapat meningkatkan stres oksidatif, inflamasi, serta perubahan metabolik yang menyerupai kondisi penuaan alami.

5.1.1 Pemeriksaan Kadar GPx pada Darah

Hasil analisis kadar GPx menunjukkan bahwa rerata tertinggi terdapat pada kelompok K2 ($27,87 \pm 1,35$ ng/L), diikuti oleh K3 ($22,43 \pm 4,05$ ng/L), K4 ($19,66 \pm 0,71$ ng/L), dan terendah pada kelompok K1 ($15,73 \pm 2,07$ ng/L). Uji normalitas dengan *Shapiro-Wilk* menunjukkan nilai $p > 0,05$ pada seluruh kelompok (K1: $p = 0,179$; K2: $p = 0,266$; K3: $p = 0,056$; K4: $p = 0,293$), sehingga dapat disimpulkan bahwa data terdistribusi normal. Uji homogenitas varians menggunakan *Levene's Test* menghasilkan nilai $p = 0,093$ ($p > 0,05$), yang berarti varians antar kelompok homogen. Karena data berdistribusi normal dan homogen, maka analisis dilanjutkan dengan uji *One Way ANOVA*. Hasil uji *One Way ANOVA* menunjukkan nilai $p < 0,001$ ($p < 0,05$), yang menandakan terdapat perbedaan bermakna kadar GPX antar kelompok perlakuan. Dengan demikian, diperlukan uji *Post Hoc (Tukey)* untuk mengetahui kelompok mana saja yang berbeda secara signifikan.

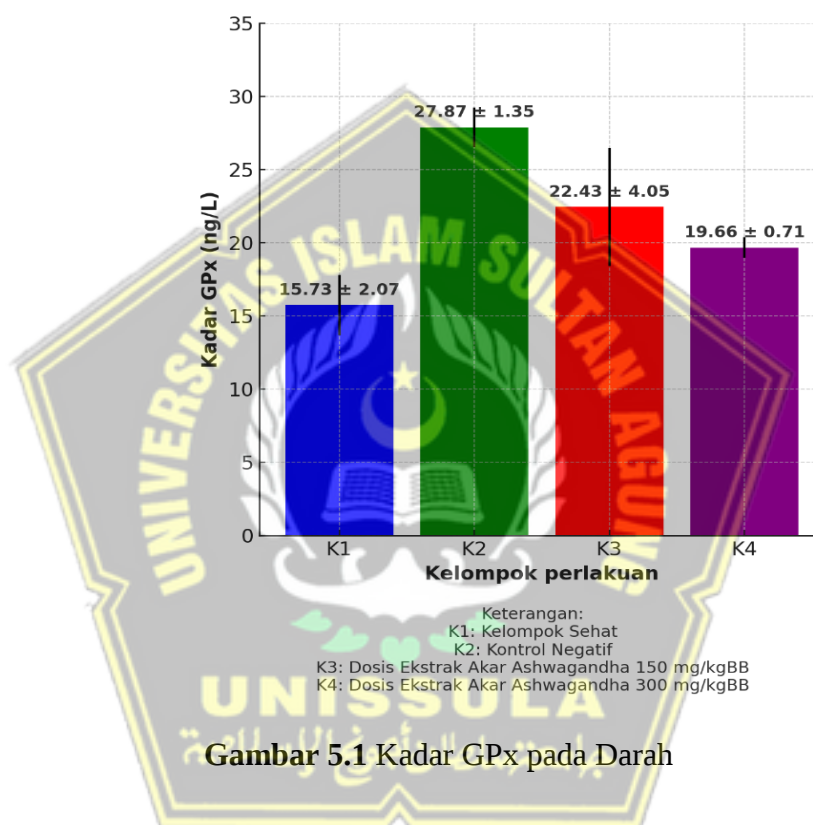
Tabel 5.1 Kadar GPx pada Darah

Variabel	Kelompok				<i>p</i> <i>value</i>
	K1	K2	K3	K4	
	Rerata±SD	Rerata±SD	Rerata±SD	Rerata±SD	
Kadar GPx (ng/L)	15,73 ± 2,07	27,87 ± 1,35	22,43 ± 4,05	19,66 ± 0,71	
<i>Saphiro Wilk</i>	0,179	0,266	0,056	0,293	
<i>Levene's Test</i>					0,093
<i>One Way ANOVA</i>					<0,001 *

Berdasarkan hasil uji *Post Hoc Tukey* terhadap kadar GPx pada tabel 5.2, diperoleh perbedaan bermakna ($p < 0,05$) antara K1 dan K2, K1 dan K3, serta K2 dengan K3 dan K4. Sementara itu, tidak ditemukan perbedaan bermakna antara K1 dan K4 ($p = 0,071$) maupun antara K3 dan K4 ($p = 0,281$). Hasil ini menunjukkan bahwa kelompok kontrol negatif (K2) memiliki kadar GPx 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, pemberian ekstrak Ashwagandha dosis 150 mg/kgBB (K3) mampu menurunkan kadar GPx secara signifikan dibanding K2, namun tidak berbeda bermakna dengan kelompok dosis 300 mg/kgBB (K4). Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa ekstrak akar Ashwagandha, baik pada dosis 150 mg/kgBB maupun 300 mg/kgBB, mampu menekan peningkatan kadar GPX yang terjadi pada kelompok kontrol negatif, meskipun penurunan lebih nyata terlihat pada dosis 150 mg/kgBB.

Tabel 5.2 Uji *Post Hoc* Kadar GPx

Kadar GPx				
Kelompok	K1	K2	K3	K4
K1	-	<0,001*	0,001*	0,071
K2		-	<0,008*	<0,001*
K3			-	0,281
K4				-



Gambar 5.1 Kadar GPx pada Darah

5.1.2 Pemeriksaan Kadar TNF- α pada Darah

Hasil analisis kadar TNF- α menunjukkan bahwa rerata tertinggi terdapat pada kelompok K4 ($232,70 \pm 13,86$ ng/L), diikuti oleh K2 ($186,26 \pm 12,30$ ng/L), K1 ($172,78 \pm 7,66$ ng/L), dan terendah pada kelompok K3 ($171,66 \pm 13,58$ ng/L). Uji normalitas dengan *Shapiro-Wilk* menunjukkan bahwa seluruh kelompok memiliki nilai $p > 0,05$ (K1: $p = 0,990$; K2: $p = 0,810$; K3: $p = 0,993$; K4: $p = 0,243$),

sehingga data dapat disimpulkan terdistribusi normal. Uji homogenitas varians menggunakan *Levene's Test* memberikan hasil $p=0,660$ ($p>0,05$), yang berarti varians antar kelompok homogen. Karena data berdistribusi normal dan homogen, maka analisis dilanjutkan dengan uji *One Way ANOVA*. Hasil uji *One Way ANOVA* menunjukkan nilai $p<0,001$ ($p<0,05$), menandakan adanya perbedaan bermakna kadar TNF- α antar kelompok perlakuan. Dengan demikian, diperlukan analisis lanjutan menggunakan uji *Post Hoc (Tukey)* untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda signifikan.

Tabel 5.3 Kadar TNF- α pada Darah

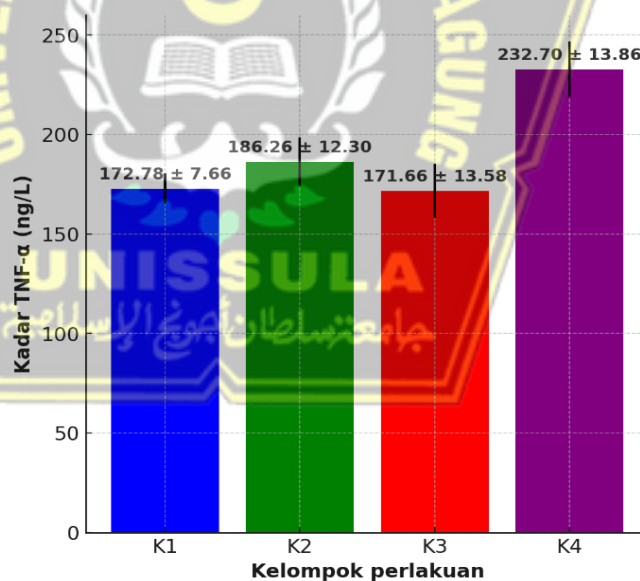
Variabel	Kelompok				<i>p value</i>
	K1	K2	K3	K4	
	Rerata $\pm$ SD	Rerata $\pm$ SD	Rerata $\pm$ SD	Rerata $\pm$ SD	
Kadar TNF-α (ng/L)	172,78 $\pm$ 7,66	186,26 $\pm$ 12,30	171,66 $\pm$ 13,58	232,70 $\pm$ 13,86	
<i>Saphiro Wilk</i>	0,99	0,810	0,993	0,243	
<i>Levene's Test</i>					0,660
<i>One Way ANOVA</i>					<0,001*

Berdasarkan hasil uji *Post Hoc Tukey* terhadap kadar TNF- α , diperoleh perbedaan bermakna ($p<0,05$) antara K1 dan K4, K2 dan K4, serta K3 dan K4. Sementara itu, tidak terdapat perbedaan bermakna antara K1 dan K2 ($p=0,248$), K1 dan K3 ($p=0,999$), maupun K2 dan K3 ($p=0,191$). Hasil ini menunjukkan bahwa kelompok K4 (Ashwagandha dosis 300 mg/kgBB) memiliki kadar TNF- α yang secara signifikan lebih tinggi dibandingkan kelompok sehat (K1), kontrol negatif (K2), maupun Ashwagandha dosis 150 mg/kgBB (K3).

Sementara itu, kadar TNF- α pada kelompok K1, K2, dan K3 tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna satu sama lain. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak akar Ashwagandha dosis 300 mg/kgBB justru meningkatkan kadar TNF- α dibandingkan kelompok lain, sedangkan dosis 150 mg/kgBB tidak memberikan perubahan signifikan dibandingkan kelompok sehat maupun kontrol negatif.

Tabel 5.4 Uji Post Hoc Kadar TNF- α

Kadar TNF-α				
Kelompok	K1	K2	K3	K4
K1	-	0,248	0,999	<0,001*
K2	-	-	0,191	<0,001*
K3	-	-	-	<0,001*
K4	-	-	-	-



Keterangan:
 K1: Kelompok Sehat
 K2: Kontrol Negatif
 K3: Dosis Ekstrak Akar Ashwagandha 150 mg/kgBB
 K4: Dosis Ekstrak Akar Ashwagandha 300 mg/kgBB

Gambar 5.2 Kadar TNF- α pada Darah

5.2 Pembahasan

Penggunaan kombinasi D-galaktosa (D-gal) dan diet tinggi lemak (*high-fat diet*/HFD) dalam penelitian ini bertujuan membentuk model *inflammaging* pada tikus Wistar. D-gal dalam dosis kronis mengalami auto-oksidasi menghasilkan radikal bebas, serta membentuk *advanced glycation end products* (AGEs). AGEs berikatan dengan reseptornya (RAGE), mengaktifasi jalur transduksi sinyal NF- κ B, dan meningkatkan ekspresi sitokin proinflamasi seperti TNF- α dan IL-6. Selain itu, metabolisme D-gal melalui aldosa reduktase menghasilkan sorbitol yang berkontribusi pada peningkatan ROS, menyebabkan kerusakan DNA, protein, dan lipid. Diet tinggi lemak memperburuk kondisi dengan meningkatkan kadar asam lemak bebas, menyebabkan lipotoksisitas, resistensi insulin, dan kerusakan mitokondria. Aktivasi reseptor TLR4 pada adiposit dan makrofag oleh asam lemak bebas memicu inflammasome NLRP3, yang pada akhirnya meningkatkan sekresi sitokin proinflamasi. Dengan demikian, kombinasi D-gal dan HFD secara sinergis mempercepat terjadinya stres oksidatif dan inflamasi sistemik, meniru kondisi biologis penuaan fisiologis (*accelerated aging*).^{35,36}

Penelitian ini menunjukkan bahwa rerata kadar GPx serum meningkat signifikan pada kelompok kontrol negatif (K2: $27,87 \pm 1,35$ ng/L) dibandingkan kelompok sehat (K1: $15,73 \pm 2,07$ ng/L). Setelah diberikan ekstrak *Withania somnifera* (ashwagandha), kadar GPx mengalami penurunan pada kelompok perlakuan, yaitu K3 ($22,43 \pm 4,05$ ng/L) dan K4 ($19,66 \pm 0,71$

ng/L), meskipun keduanya tetap lebih tinggi dibanding K1. Uji *Post Hoc* memperkuat temuan ini dengan menunjukkan perbedaan bermakna antara K1 dan K2 ($p < 0,001$), serta antara K2 dengan K3 ($p = 0,008$) dan K2 dengan K4 ($p < 0,001$). Sebaliknya, perbedaan antara K3 dan K4 tidak signifikan ($p = 0,281$). Pola ini menunjukkan adanya respons kompensasi antioksidan pada kondisi *inflammaging* yang kemudian mengalami normalisasi setelah pemberian ashwagandha.

Induksi D-galaktosa dikombinasikan dengan diet tinggi lemak meningkatkan produksi ROS secara signifikan. Kondisi ini mengaktifasi jalur transduksi sinyal Nrf2–ARE, yang berperan dalam menginduksi ekspresi berbagai enzim antioksidan, termasuk *glutathione peroksidase* (GPx). Aktivasi jalur ini pada fase awal biasanya menghasilkan peningkatan kadar GPx sebagai upaya adaptasi protektif terhadap lonjakan ROS. Hasil uji *Post Hoc* (K1 vs K2, $p < 0,001$) mendukung fenomena ini, di mana kadar GPx meningkat signifikan pada kelompok kontrol negatif dibanding kelompok sehat. Penelitian sebelumnya pada model hewan terinduksi D-gal juga melaporkan peningkatan aktivitas GPx pada fase awal paparan, sejalan dengan hasil penelitian ini.³⁷

Meskipun demikian, beberapa kajian lain melaporkan adanya penurunan aktivitas enzim antioksidan, termasuk GPx, pada paparan D-galaktosa atau HFD kronis. Hal ini sangat dipengaruhi oleh faktor jaringan yang diperiksa, usia hewan coba, serta lama dan waktu paparan.^{38,39} Sebagai contoh, penelitian pada jaringan jantung memperlihatkan penurunan aktivitas

SOD dan GPx akibat paparan D-gal jangka panjang. Dengan demikian, peningkatan kadar GPx pada K2 dalam penelitian ini lebih tepat dipahami sebagai fase kompensasi awal terhadap stres oksidatif, yang konsisten dengan aktivasi Nrf2, sedangkan pada paparan lebih lama mekanisme protektif ini dapat menurun akibat kelelahan antioksidan.⁴⁰

Pemberian ekstrak akar ashwagandha menghasilkan penurunan kadar GPx signifikan dibanding K2 (K2 vs K3, $p = 0,008$; K2 vs K4, $p < 0,001$). Penurunan ini menunjukkan bahwa intervensi ashwagandha mampu mengurangi beban oksidatif, sehingga tubuh tidak perlu lagi mempertahankan ekspresi GPx pada kadar yang tinggi. GPx bekerja bersama SOD dan katalase sebagai garis depan antioksidan enzimatis. SOD mengubah radikal superoksida ($O_2 \cdot^-$) menjadi $H_2 O_2$, sedangkan GPx mengubah $H_2 O_2$ menjadi $H_2 O$ dengan bantuan glutathion (GSH).⁴¹ Mekanisme yang mendasari efek ini diduga melalui modulasi jalur Nrf2/HO-1, sebagaimana ditunjukkan pada beberapa penelitian yang melaporkan bahwa withanolide, komponen bioaktif utama ashwagandha, menurunkan ROS dan menormalkan homeostasis redoks.^{41,42}

Peningkatan kadar GPx pada K2 dapat dijelaskan sebagai mekanisme homeostasis redoks. Ketika ROS meningkat akibat induksi D-gal dan HFD, Nrf2 dilepaskan dari ikatan dengan Keap1, lalu translokasi ke inti dan mengikat *antioxidant response element* (ARE). Hal ini meningkatkan transkripsi GPx1. Peningkatan GPx di K2 adalah respon kompensasi tubuh untuk mempertahankan homeostasis redoks dengan mereduksi $H_2 O_2$

menggunakan GSH sebagai donor elektron. Mekanisme ini mencegah H_2O_2 berubah menjadi radikal hidroksil ($\bullet OH$) yang sangat toksik.^{45,46} Pasca pemberian ashwagandha, kadar GPx menurun pada K3 dan K4 karena beban ROS berhasil ditekan. *Withanolide* dalam ashwagandha menurunkan produksi ROS mitokondria, meningkatkan regenerasi GSH melalui aktivasi *glutathione reductase*, dan menormalkan sinyal Nrf2. Dengan demikian, tubuh tidak lagi mempertahankan GPx tinggi secara kompensasi, melainkan kembali ke homeostasis fisiologis.^{47,48}

Pada pemeriksaan kadar TNF- α menunjukkan adanya variasi pada masing-masing kelompok. Kelompok kontrol negatif (K2: $186,26 \pm 12,30$ ng/L) mengalami peningkatan kadar TNF- α dibandingkan kelompok sehat (K1: $172,78 \pm 7,66$ ng/L), meskipun perbedaan ini tidak signifikan ($p = 0,248$). Pemberian ekstrak *Withania somnifera* dosis rendah (K3: $171,66 \pm 13,58$ ng/L) menghasilkan penurunan kadar TNF- α mendekati kelompok sehat dan tidak berbeda signifikan dari K1 ($p = 0,999$). Sebaliknya, kelompok perlakuan dosis tinggi (K4: $232,70 \pm 13,86$ ng/L) menunjukkan peningkatan signifikan kadar TNF- α dibandingkan seluruh kelompok lainnya ($p < 0,001$). Hasil uji ANOVA ($p < 0,001$) dan *Post Hoc* mendukung perbedaan tersebut secara statistik.

Kenaikan kadar TNF- α pada kelompok kontrol negatif mencerminkan aktivasi respon inflamasi akibat paparan D-galaktosa dan diet tinggi lemak. Paparan tersebut diketahui meningkatkan stres oksidatif, yang kemudian mengaktivasi jalur transkripsi NF- κB , sehingga mendorong produksi sitokin

proinflamasi termasuk TNF- α . Peningkatan sitokin ini merupakan karakteristik *inflammaging*, yaitu inflamasi kronis tingkat rendah yang ditandai dengan akumulasi ROS dan disfungsi mekanisme antioksidan fisiologis. Dengan demikian, hasil pada K2 sejalan dengan literatur yang menyebutkan bahwa induksi D-galaktosa dan HFD mempercepat proses penuaan melalui peningkatan TNF- α sebagai mediator utama inflamasi sistemik.^{36,37}

Pemberian ekstrak ashwagandha dosis 150 mg/kgBB (K3) menurunkan kadar TNF- α sehingga tidak berbeda signifikan dengan kelompok sehat. Hal ini menegaskan efek antiinflamasi ashwagandha yang telah dilaporkan menekan aktivasi NF- κ B dan menurunkan ekspresi TNF- α melalui modulasi jalur redoks Nrf2-HO-1.⁴⁵ Penelitian lain menunjukkan bahwa ashwagandha secara *in vitro* menghambat ekspresi IL-1 β dan TNF- α serta menurunkan produksi superoksida.⁴⁶ Studi lain juga melaporkan bahwa ekstrak ashwagandha menghambat jalur NF- κ B dan MAPK, yang berdampak pada penurunan TNF- α . Dengan demikian, dosis rendah terbukti memberikan efek protektif terhadap inflamasi yang diinduksi D-galaktosa dan HFD.⁴⁷

Keseimbangan sistem imun atau homeostasis imun pada kelompok K2 mengalami pergeseran yang ditandai dengan peningkatan kadar TNF- α . Tubuh berusaha mengatasi stres oksidatif melalui aktivasi NF- κ B oleh ROS, yang kemudian memicu ekspresi TNF- α sebagai mediator inflamasi. Upaya adaptif ini menunjukkan adanya mekanisme kompensasi, namun kadar TNF- α yang lebih tinggi mengindikasikan bahwa homeostasis bergeser ke arah

proinflamasi.⁴⁷ Pemberian ashwagandha dosis rendah (K3) mengembalikan keseimbangan tersebut dengan menormalkan kadar TNF- α . Jalur molekuler yang berperan meliputi penghambatan fosforilasi I κ B sehingga NF- κ B tetap berada di sitoplasma, aktivasi Nrf2/HO-1 yang meningkatkan produksi enzim sitoprotektif, serta modulasi MAPK (p38, JNK) yang menekan transkripsi TNF- α . Melalui mekanisme ini, homeostasis inflamasi berhasil dipulihkan, ditunjukkan dengan kadar TNF- α yang kembali mendekati kondisi fisiologis (K1).⁴⁹ Homeostasis kembali terganggu pada kelompok K4, di mana kadar TNF- α meningkat tajam. Pemberian ashwagandha dosis tinggi berpotensi menimbulkan stres oksidatif sekunder, yang muncul akibat akumulasi metabolit fitokimia. Kondisi ini meningkatkan ROS, mengaktivasi inflammasome NLRP3, serta menstimulasi ulang jalur NF- κ B. Hasilnya, transkripsi TNF- α melonjak lebih tinggi, mencerminkan kegagalan menjaga homeostasis. Sistem imun justru mengalami hiperaktivasi, meskipun kadar ROS total tampak lebih rendah sebagaimana ditunjukkan oleh penurunan aktivitas GPx.^{49,52}

Secara keseluruhan, penelitian ini menunjukkan bahwa induksi D-galaktosa dan diet tinggi lemak dapat memicu stres oksidatif dan inflamasi sistemik. Pada kelompok kontrol negatif (K2) didapatkan peningkatan signifikan kadar GPx dan TNF- α . Pemberian ekstrak akar Ashwagandha dosis 150 mg/kgBB/hari terbukti menurunkan kadar GPx mendekati nilai normal serta menekan kadar TNF- α hingga tidak berbeda signifikan dengan kelompok sehat. Temuan ini mengindikasikan bahwa Ashwagandha bekerja

melalui mekanisme antioksidan (jalur Nrf2–ARE) dan antiinflamasi (inhibisi NF- κ B). Sebaliknya, dosis 300 mg/kgBB/hari memberikan efek ganda: penurunan GPx yang signifikan, namun diikuti dengan peningkatan tajam TNF- α . Fenomena ini menunjukkan adanya pola *dose-response* biphasic atau hormesis, di mana dosis rendah hingga moderat bersifat protektif, sementara dosis tinggi justru menimbulkan kecenderungan pro-inflamasi.^{43,45,51}

Meskipun hasil penelitian yang dilakukan belum bisa membuktikan hipotesis, penelitian ini juga memiliki keterbatasan. Pertama, hasil pada tikus belum sepenuhnya bisa diterapkan pada manusia karena perbedaan metabolisme, fisiologi, dan sistem imun. Kedua, model *inflammaging* dengan induksi penuaan buatan dalam hal ini D-galaktosa mungkin akan berbeda dibandingkan dengan penuaan alami. Ketiga, rentang durasi penelitian 28 hari memberikan efek pada pemberian dosis yang berbeda. Keempat, pengukuran kadar GPx dan TNF- α tidak cukup mewakili seluruh mekanisme *inflammaging*. Oleh karena itu, penelitian lanjutan dengan rentang dosis lebih luas dan analisis mekanisme molekuler yang lebih detail sangat diperlukan untuk menegaskan dosis optimal Ashwagandha yang efektif dan aman dalam modifikasi stres oksidatif serta inflamasi pada kondisi *inflammaging*.

BAB VI

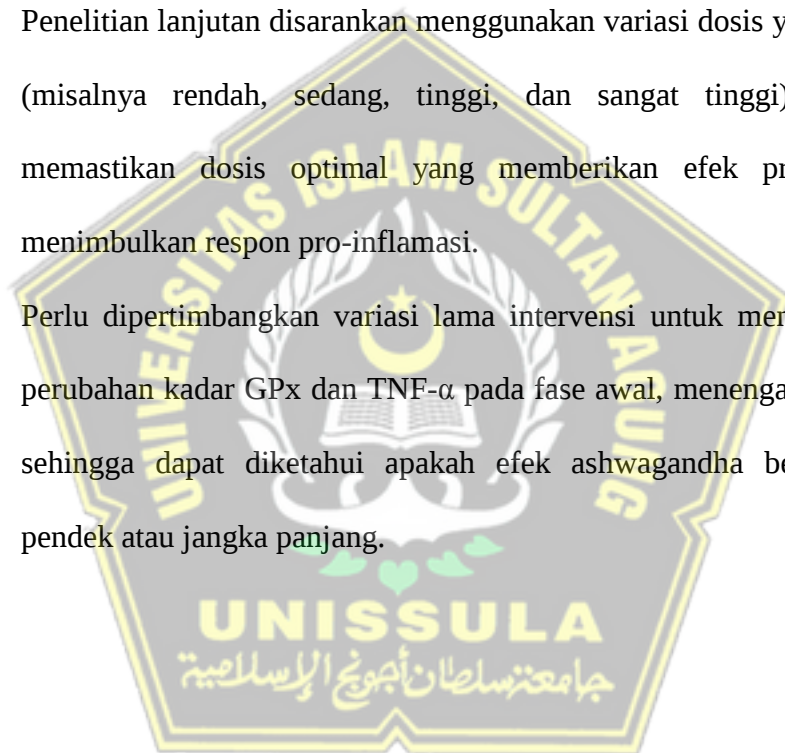
KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

1. Terdapat pengaruh signifikan pemberian ekstrak akar Ashwagandha terhadap kadar GPx dan TNF- α pada tikus jantan galur wistar yang diinduksi D-galaktosa dan diet tinggi lemak.
2. Terdapat pengaruh signifikan pemberian ekstrak akar Ashwagandha dosis 150 mg/kgBB/hari dan 300 mg/kgBB/hari terhadap kadar GPx pada tikus jantan galur wistar yang diinduksi D-galaktosa dan diet tinggi lemak.
3. Terdapat pengaruh signifikan pemberian ekstrak akar Ashwagandha dosis 150 mg/kgBB/hari dan 300 mg/kgBB/hari terhadap kadar TNF- α pada tikus jantan galur wistar yang diinduksi D-galaktosa dan diet tinggi lemak.
4. Pemberian ekstrak akar Ashwagandha menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara K2 – K3 dan K2 – K4 terhadap kadar GPx. Sebaliknya antara K3 – K4 tidak signifikan terhadap kadar GPx. Pemberian ekstrak akar Ashwagandha menunjukkan adanya perbedaan bermakna masing-masing kelompok. K2 mengalami peningkatan kadar TNF- α bila dibandingkan dengan K3. K2 mengalami penurunan kadar TNF- α bila dibandingkan dengan K4. K3 mengalami penurunan kadar TNF- α bila dibandingkan dengan K4. Sedangkan K4 menunjukkan peningkatan signifikan kadar TNF- α dibandingkan kelompok lainnya.

6.2 Saran

1. Penelitian selanjutnya disarankan adanya validasi pemeriksaan glukosa darah, HDL, LDL, kolesterol sebelum perlakuan untuk identifikasi metabolik.
2. Penelitian lanjutan disarankan pada tikus dengan penuaan alami untuk mengetahui perubahan kadar GPx dan TNF- α .
3. Penelitian lanjutan disarankan menggunakan variasi dosis yang lebih luas (misalnya rendah, sedang, tinggi, dan sangat tinggi) agar dapat memastikan dosis optimal yang memberikan efek protektif tanpa menimbulkan respon pro-inflamasi.
4. Perlu dipertimbangkan variasi lama intervensi untuk menilai dinamika perubahan kadar GPx dan TNF- α pada fase awal, menengah, dan kronis, sehingga dapat diketahui apakah efek ashwagandha bersifat jangka pendek atau jangka panjang.



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 Transduct Target Ther*. 2022 Dec 16;7(1):391.
3. Franceschi C, Campisi J. Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2014 Jun 1;69(Suppl 1):S4–9.
4. Di Micco R, Krizhanovsky V, Baker D, d'Adda di Fagagna F. Cellular Senescence in Ageing: from Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021 Feb 16;22(2):75–95.
5. 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. *Med Res Rev*. 2021 Jan 25;41(1):630–703.
6. Choudhary D, Bhattacharyya S, Bose S. Efficacy and Safety of Ashwagandha (*Withania somnifera* (L.) Dunal) Root Extract in Improving Memory and Cognitive Functions. *J Diet Suppl*. 2017 Nov 2;14(6):599–612.
7. 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. *Curr Neuropharmacol*. 2021 Sep;19(9):1468–95.
8. Gulcin İ. Antioxidants and Antioxidant Methods: An Updated Overview. *Archives of Toxicology*. 2020 Mar 16;94(3):651–715.
9. Jain V, Chaturvedi S, Jamil S, Tyagi R, Arya S, Madan S. Ashwagandha: Botanic Occurrence, Conventional Uses, and Significance in Heart, Metabolic, Renal and Hepatic Disorder. *Nutrition & Food Science*. 2024 Oct 25;54(8):1337–55.
10. Khan MA, Ahmed RS, Chandra N, Arora VK, Ali A. In vivo, Extract from *Withania somnifera* Root Ameliorates Arthritis via Regulation of Key Immune Mediators of Inflammation in Experimental Model of Arthritis. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*. 2019 Feb 6;18(1):55–70.

11. Sharma I, Kumar R, Sharma V, Singh B, Pati PK, Sharma A. *Withania somnifera*. In: *Himalayan Medicinal Plants*. Elsevier; 2021. p. 273–325.
12. Hashem HA, Nabil ZI, EL-Hak HNG. Ashwagandha Root Extract's Phenolic Compound Counteracts Alloxan's Effects on Oxidative Stress, Inflammatory Cytokines, and Peripheral Neuropathy in Rats. *Comparative Clinical Pathology*. 2023 Jun 30;32(5):867–80.
13. Alanazi HH, Elfaki E. The Immunomodulatory Role of *Withania somnifera* (L.) Dunal in Inflammatory Diseases. *Front Pharmacol*. 2023 Feb 22;14.
14. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, et al. Oxidative Stress, Aging, and Diseases. *Clinical Interventions in Aging*. 2018 Apr;Volume 13:757–72.
15. Blackburn, H. E, Epel ES, Lin J. Human Telomere Biology: A Contributory and Interactive Factor in Aging, Disease Risks, and Protection. *Science* (1979). 2015;350(6265):1193–8.
16. Mittler R, Zandalinas SI, Fichman Y, Van Breusegem F. Reactive Oxygen Species Signalling in Plant Stress Responses. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2022 Oct 27;23(10):663–79.
17. Kirkwood TBL, Kowald A. The Free- Radical Theory of Ageing—Older, Wiser and Still Alive: Modelling Positional Effects of the Primary Targets of ROS Reveals New Support. *BioEssays*. 2012 Aug 29;34(8):692–700.
18. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. Hallmarks of Aging: An Expanding Universe. *Cell*. 2020;186(2):243–78.
19. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free Radicals in Biology and Medicine*. USA: Oxford University Press; 2015.
20. 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. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016(1):3164734.
21. Heneka MT, Carson MJ, Khoury J El, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *Lancet Neurol*. 2015 Apr;14(4):388–405.
22. Syed AA, Reza MI, Singh P, Thombre GK, Gayen JR. *Withania somnifera* in Neurological Disorders: Ethnopharmacological Evidence, Mechanism of Action and its Progress in Delivery Systems. *Current Drug Metabolism*. 2021 Sep 14;22(7):561–71.

23. Gupta V, Srivastava R. Ashwagandha Diminishes Hippocampal Apoptosis Induced by Microwave Radiation by Acetylcholinesterase Dependent Neuro-Inflammatory Pathway in Male *Coturnix coturnix Japonica*. *Neurochem Res*. 2024 Jul 20;49(7):1687–702.
24. Hou K, Wu ZX, Chen XY, Wang JQ, Zhang D, Xiao C, et al. Microbiota in Health and Diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2022 Apr 23;7(1):135.
25. Sandhu JS, Shah B, Shenoy S, Chauhan S, Lavekar GS, Padhi MM. Effects of *Withania somnifera* (Ashwagandha) and *Terminalia arjuna* (Arjuna) on Physical Performance and Cardiorespiratory Endurance in Healthy Young Adults. *International journal of Ayurveda research*. 2010 Jul;1(3):144–9.
26. Pratte MA, Nanavati KB, Young V, Morley CP. An Alternative Treatment for Anxiety: A Systematic Review of Human Trial Results Reported for the Ayurvedic Herb Ashwagandha (*Withania somnifera*). *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 2014 Dec;20(12):901–8.
27. Raut N, Dörsch P, Sitaula BK, Bakken LR. Soil Acidification by Intensified Crop Production in South Asia Results in Higher N₂O/(N₂+ N₂O) Product Ratios of Denitrification. *Soil Biol Biochem*. 2012 Dec;55:104–12.
28. Bharti, K. V, Malik JK, Gupta RC. Ashwagandha: Multiple Health Benefits. *Nutraceuticals*. Academic Press. 2016;717–33.
29. Kumar S, Ahlawat W, Kumar R, Dilbaghi N. Graphene, Carbon Nanotubes, Zinc Oxide and Gold as Elite Nanomaterials for Fabrication of Biosensors for Healthcare. *Biosens Bioelectron*. 2015 Aug;70:498–503.
30. Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age with Human's. *Int J Prev Med*. 2013 Jun;4(6):624–30.
31. 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.
32. Tan BL, Norhaizan ME. Effect of High-Fat Diets on Oxidative Stress, Cellular Inflammatory Response and Cognitive Function. *Nutrients*. 2019 Oct 25;11(11):2579.
33. Lee JY, Bae E, Kim HY, Lee KM, Yoon SS, Lee DC. High-Fat-Diet–Induced Oxidative Stress Linked to the Increased Colonization of *Lactobacillus sakei* in an Obese Population. Cuomo CA, editor. *Microbiology Spectrum*. 2021 Sep 3;9(1).

34. Kim KA, Gu W, Lee IA, Joh EH, Kim DH. High Fat Diet-Induced Gut Microbiota Exacerbates Inflammation and Obesity in Mice via the TLR4 Signaling Pathway. Chamaillard M, editor. PLoS ONE. 2012 Oct 16;7(10):e47713.
35. Bo-Htay C, Palee S, Apaijai N, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Effects of d-galactose-induced ageing on the heart and its potential interventions. Vol. 22, Journal of Cellular and Molecular Medicine. Blackwell Publishing Inc.; 2018. p. 1392–410.
36. 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.
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. Jarukamjorn K, Jearapong N, Pimson C, Chatuphonprasert W. A High-Fat, High-Fructose Diet Induces Antioxidant Imbalance and Increases the Risk and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice. Scientifica (Cairo). 2016;2016.
39. 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.
40. Gutiérrez-Cuevas J, Galicia-Moreno M, Monroy-Ramírez HC, Sandoval-Rodriguez A, García-Bañuelos J, Santos A, et al. The Role of NRF2 in Obesity-Associated Cardiovascular Risk Factors. Vol. 11, Antioxidants. MDPI; 2022.
41. Pal A, Kumar KH, Bhushan B, Saharan V. Ashwagandha root extract inhibits acetylcholine esterase, protein modification and ameliorates H₂O₂-Induced oxidative stress in rat lymphocytes. Pharmacognosy Journal. 2017;9(3):302–9.
42. Bashir A, Nabi M, Tabassum N, Afzal S, Ayoub M. An updated review on phytochemistry and molecular targets of Withania somnifera (L.) Dunal (Ashwagandha). Vol. 14, Frontiers in Pharmacology. Frontiers Media S.A.; 2023.
43. Sajadimajd S, Khazaei M. Oxidative Stress and Cancer: The Role of Nrf2. Curr Cancer Drug Targets. 2018 Jun 11;18(6):538–57.

44. 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.
45. Grunz-Borgmann E, Mossine V, Fritsche K, Parrish AR. Ashwagandha attenuates TNF- α - and LPS-induced NF- κ B activation and CCL2 and CCL5 gene expression in NRK-52E cells. BMC Complement Altern Med. 2015 Dec 15;15(1).
46. Krishnaraju AV, Somepalli V, Thanawala S, Shah R. Efficacy and Anti-Inflammatory Activity of Ashwagandha Sustained-Release Formulation on Depression and Anxiety Induced by Chronic Unpredictable Stress: in vivo and in vitro Studies. J Exp Pharmacol. 2023;15:291–305.
47. Mikulska P, Malinowska M, Ignacyk M, Szustowski P, Nowak J, Pesta K, et al. Ashwagandha (*Withania somnifera*)—Current Research on the Health-Promoting Activities: A Narrative Review. Vol. 15, Pharmaceutics. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.
48. Agathokleous E, Calabrese EJ. Hormesis: The dose response for the 21st century: The future has arrived. Vol. 425, Toxicology. Elsevier Ireland Ltd; 2019.
49. Calabrese EJ, Mattson MP. How does hormesis impact biology, toxicology, and medicine? Vol. 3, npj Aging and Mechanisms of Disease. Nature Publishing Group; 2017.
50. Guo S, Rezaei MJ. The benefits of ashwagandha (*Withania somnifera*) supplements on brain function and sports performance. Vol. 11, Frontiers in Nutrition. Frontiers Media SA; 2024.
51. 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.
52. 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.