



**EFEK IMUNOMODULASI EKSTRAK ETANOLIK BAWANG
KUCAI (*Allium tuberosum*) TERHADAP KADAR
CD4+ DAN CD8+ TIKUS WISTAR YANG
DIINDUKSI DOXORUBICIN**

SKRIPSI

Oleh

Kiky Martha Ariesaka

NIM 132010101080

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2016**



**EFEK IMUNOMODULASI EKSTRAK ETANOLIK BAWANG
KUCAI (*Allium tuberosum*) TERHADAP KADAR
CD4+ DAN CD8+ TIKUS WISTAR YANG
DIINDUKSI DOXORUBICIN**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Pendidikan Dokter (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran

Oleh

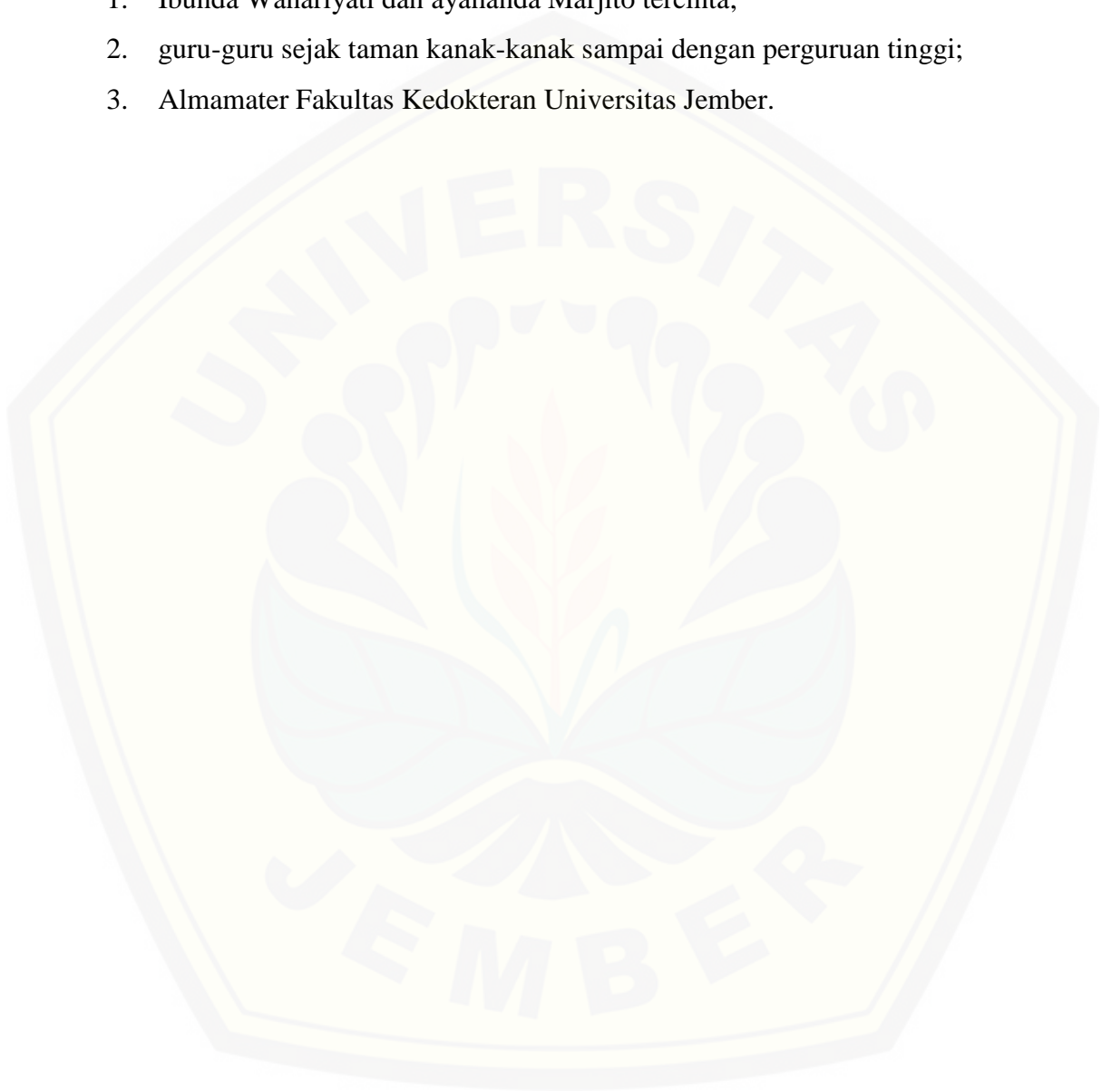
Kiky Martha Ariesaka
NIM 132010101080

FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2016

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ibunda Wanariyati dan ayahanda Marjito tercinta;
2. guru-guru sejak taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi;
3. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.



MOTO

“... dari perut lebah itu keluar minuman (madu) yang bermacam-macam warnanya, di dalamnya terdapat obat yang menyembuhkan bagi manusia. Sungguh, pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda (kebesaran Allah) bagi orang yang berpikir.”
(terjemahan Surat *An-Nahl* ayat 69)¹

“dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, betapa banyak Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam (tumbuh-tumbuhan) yang baik?”
(terjemahan Surat *Asy-Syu'ara* ' ayat 7)¹

¹ Departemen Agama Republik Indonesia. 2009. *Al Qur'an dan Terjemahannya Special for Woman*. Bandung: PT Sigma Examedia Arkleema.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Kiky Martha Ariesaka

NIM : 132010101080

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Efek Imunomodulasi Ekstrak Etanolik Bawang KUCAI (*Allium tuberosum*) terhadap Kadar CD4+ dan CD8+ Tikus Wistar yang Diinduksi Doxorubicin” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 06 Desember 2016

Yang menyatakan,

Kiky Martha Ariesaka
NIM 132010101080

SKRIPSI

**EFEK IMUNOMODULASI EKSTRAK ETANOLIK BAWANG
KUCAI (*Allium tuberosum*) TERHADAP KADAR
CD4+ DAN CD8+ TIKUS WISTAR YANG
DIINDUKSI DOXORUBICIN**

Oleh

Kiky Martha Ariesaka
NIM 132010101080

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : dr. Ika Rahmawati Sutejo, M.Biotech

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Al Munawir, M.Kes., Ph.D

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Efek Imunomodulasi Ekstrak Etanolik Bawang Kucai (*Allium tuberosum*) terhadap Kadar CD4+ dan CD8+ Tikus Wistar yang Diinduksi Doxorubicin” karya Kiky Martha Ariesaka telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Selasa, 06 Desember 2016

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Tim Penguji:

Ketua,

Anggota I,

dr. Hairrudin, M.Kes
NIP 197510112003121008

dr. Cicih Komariah, Sp.M
NIP 197409282005012001

Anggota II,

Anggota III,

dr. Ika Rahmawati Sutejo, M.Biotech
NIP 198408192009122003

dr. Al Munawir, M.Kes., Ph.D
NIP 19690901199931003

Mengesahkan
Dekan,

dr. Enny Suswati, M.Kes
NIP 197002141999032001

RINGKASAN

Efek Imunomodulasi Ekstrak Etanolik Bawang Kucai (*Allium tuberosum*) terhadap Kadar CD4+ dan CD8+ Tikus Wistar yang Diinduksi Doxorubicin; Kiky Martha Ariesaka, 132010101080; 2016; 46 halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Kanker masih menjadi salah satu penyebab utama kematian di dunia. Tingginya prevalensi dan mortalitas kanker tersebut mendorong untuk terus dikembangkannya terapi yang efektif dengan efek samping minimal. Kemoterapi yang paling banyak digunakan salah satunya doxorubicin, namun doxorubicin memiliki efek samping yang tidak dapat diabaikan, antara lain immunosupresi, kardiotoxik, hepatotoksik, dan nefrotoksik. Penurunan sistem imun diakibatkan adanya pembentukan radikal bebas dan aktivitas peroksidasi lipid. Hal tersebut menyebabkan modifikasi membran sel T limfosit yang mengakibatkan penurunan jumlah ataupun fungsi sel T termasuk CD4+ dan CD8+. Oleh karena itu diperlukan regulasi sistem imun dalam melawan efek immunosupresi sekaligus mengatasi sitotoksitas dan mereduksi efek samping doxorubicin.

Daun bawang kucai (*Allium tuberosum*) diketahui memiliki kandungan flavonoid khususnya allicin yang terbukti mampu meningkatkan jumlah CD4+, selain itu ia juga memiliki efek untuk meningkatkan *pro-inflammatory mediators* (IFN- γ , TNF dan NO). Flavonoid menunjukkan aktivitas anti-radikal dan *antichelating* yang mampu menurunkan pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS) sehingga tidak terjadi penurunan sistem imun. Tujuan penelitian ini adalah untuk menjelaskan pengaruh ekstrak etanolik *A. tuberosum* (EAT) terhadap persentase CD4+, CD8+, dan MDA pada tikus Wistar jantan yang diinduksi Doxorubicin.

Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimental murni (*true experimental design*) dengan rancangan penelitian *randomized post test only controlled group design*. Sampel yang digunakan adalah 25 ekor tikus wistar jantan yang dibagi dalam lima kelompok. Perlakuan hewan coba dilaksanakan

selama 14 hari dan pada hari terakhir hewan coba diterminasi untuk diambil limpa dan darah intracardial. Selanjutnya dilakukan uji skrining fitokimia EAT, pemeriksaan flowsitometri untuk mengukur persentase CD4+ dan CD8+, serta pemeriksaan spektrofotometri untuk mengukur kadar MDA serum. Analisis data yang digunakan adalah uji *One Way ANOVA* dengan uji lanjutan *Tuckey*, namun jika sebaran data tidak normal atau tidak homogen maka dilakukan uji *Kruskal Wallis* dengan uji lanjutan *Mann Whitney*.

Hasil uji KLT menunjukkan adanya kandungan flavonoid pada EAT, dibuktikan dengan munculnya warna kuning pada cahaya tampak dan warna kebiruan pada sinar UV 366 nm. Induksi doxorubicin dengan pemberian EAT pada kelompok P2 dan P3 menunjukkan persentase CD4+ yang lebih tinggi secara bermakna ($p=0,009$) dibandingkan dengan kelompok yang diinduksi doxorubicin saja. Tidak berbeda halnya dengan persentase CD8+ pada ketiga kelompok tersebut, kelompok P2 dan P3 menunjukkan nilai yang lebih besar dibandingkan dengan induksi doxorubicin saja. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian doxorubicin dengan diikuti pemberian EAT menunjukkan efek imunostimulan terhadap sel CD4+ dan CD8+. Untuk mengonfirmasi mekanisme imunomodulasi tersebut, dilakukan pemeriksaan kadar MDA serum sebagai indikator stres oksidatif. Pemberian doxorubicin diikuti dengan pemberian EAT pada kelompok P2 dan P3 menunjukkan kadar MDA yang lebih rendah dibandingkan induksi doxorubicin saja. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian EAT pada induksi doxorubicin mampu mengurangi tingkatan stres oksidatif.

Penambahan antioksidan seperti flavonoid mampu menghambat reaksi peroksidasi lipid pada tahap inisiasi dan propagasi. Pada tahap inisiasi dan propagasi, flavonoid memberikan donor atom hidrogen dari gugus hidroksilnya pada radikal bebas sehingga radikal bebas bersifat stabil. Kestabilan ini menyebabkan terhentinya reaksi berantai peroksidasi lipid. Hal tersebut menunjukkan aktivitas antioksidan EAT merupakan salah satu mekanisme terjadinya peningkatan imunitas. Efek imunostimulan tersebut juga ditandai dengan adanya peningkatan persentase CD4+ dan CD8+ secara bermakna.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Efek Imunomodulasi Ekstrak Etanolik Bawang Kucai (*Allium tuberosum*) terhadap Kadar CD4+ dan CD8+ Tikus Wistar yang Diinduksi Doxorubicin.” Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis menyampaikan terima kasih kepada:

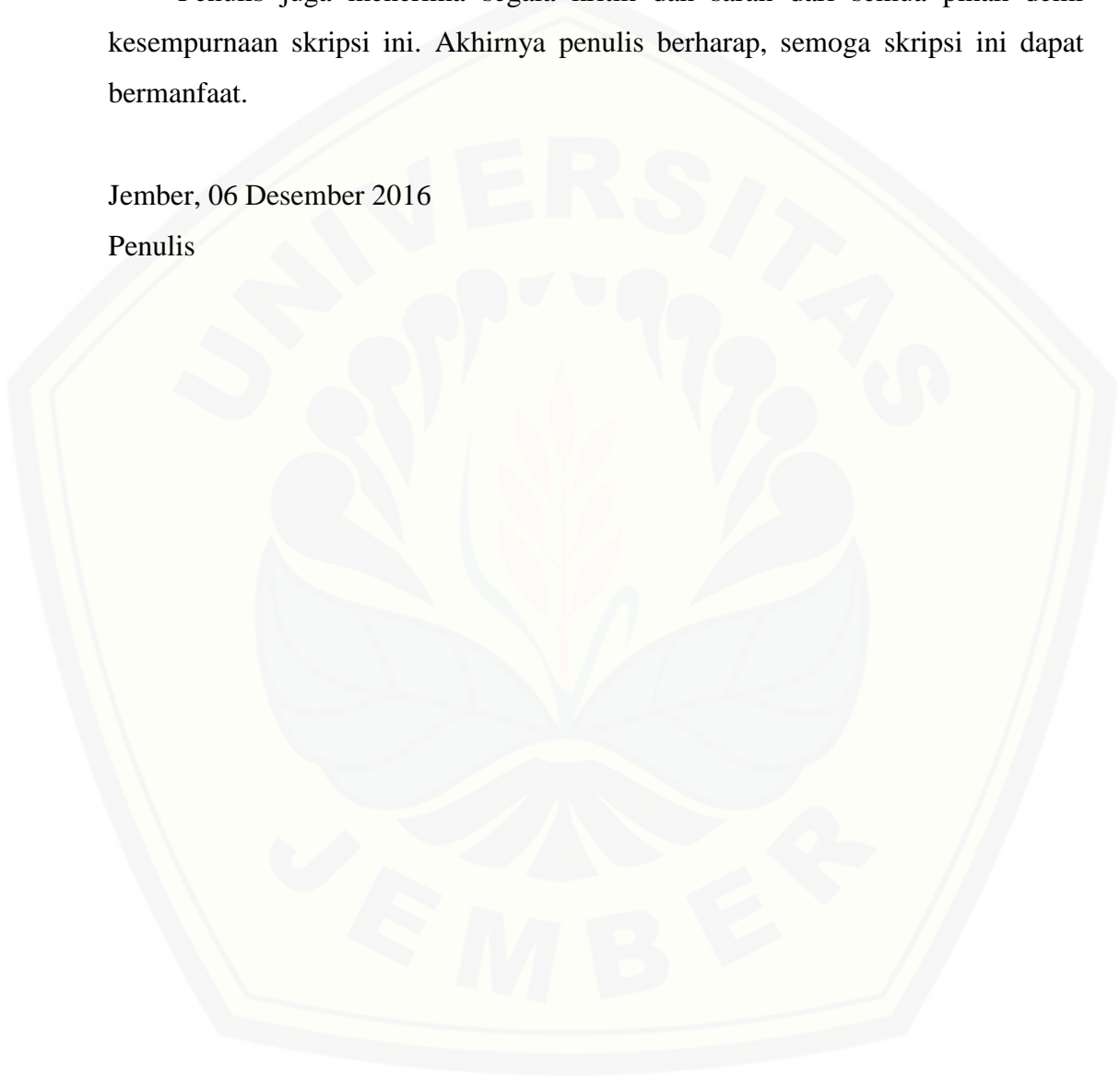
1. dr. Ika Rahmawati Sutejo, M.Biotech, selaku Dosen Pembimbing Utama dan dr. Al Munawir, M.Kes., Ph.D, selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, dan perhatian dalam penulisan skripsi ini;
2. dr. Hairuddin, M.Kes dan dr. Cicih Komariah, Sp.M, selaku Dosen Penguji yang telah meluangkan waktu dan memberi masukan dalam penulisan skripsi ini;
3. dr. Rosita Dewi dan dr. Sheilla Rachmania selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan dan motivasi selama masa perkuliahan;
4. Kementerian Riset Teknologi dan Pendidikan Tinggi (Kemenristek Dikti) dan Drs. Moh. Hasan, M.Sc., Ph.D. selaku Rektor Universitas Jember yang telah memberikan bantuan materiil melalui Program Kreativitas Mahasiswa demi terselesainya penelitian ini;
5. ayahanda Marjito dan Ibunda Wanariyati yang telah mencurahkan segala perhatian, kasih sayang, dukungan moril, materiil serta do'a tulus;
6. sahabat-sahabatku, Dian, Hilda, Rima, Adina, dan Mirza yang selama ini telah memberikan semangat, serta teman-teman Fakultas Kedokteran angkatan 2013, terima kasih atas kebersamaan, persaudaraan, dan tempat berbagi suka duka;
7. rekan kerja seperjuangan, Dian, Hilda, Taufiq, Fuad, Ain, Brili, dan Azka, terima kasih atas kerja sama, dukungan serta bantuan yang diberikan selama penelitian;

8. teknisi dan analis Lab. Biomedik FKG UNEJ, Farmakologi FK UNEJ, Biokimia FK UNEJ, Biologi Fakultas Farmasi UNEJ, dan Biomedik FK UB atas curahan waktu dan tenaga dalam berlangsungnya penelitian;
9. seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 06 Desember 2016

Penulis



DAFTAR ISI

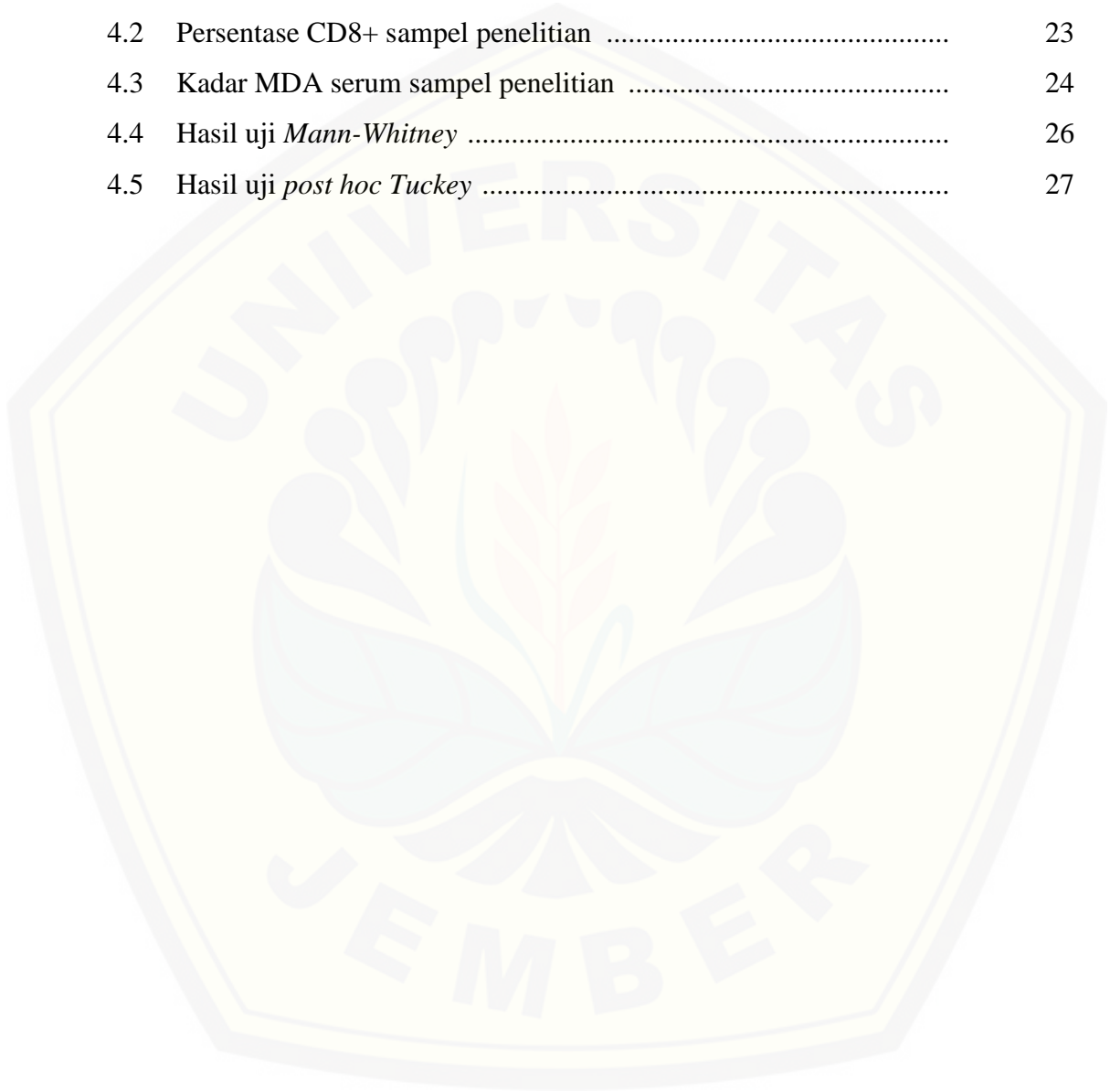
	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	2
1.4 Manfaat	3
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Doxorubicin Sebagai Kemoterapi Kanker	4
2.2 Peroksidasi Lipid Sebagai Jalur Mekanisme Imunomodulasi CD4+ CD8+	5
2.3 Ekstrak Etanolik Bawang Kucai (<i>A. tuberosum</i>) Sebagai Imunomodulator	7
2.4 Kerangka Konsep	9
2.5 Hipotesis	9

BAB 3 METODE	10
3.1 Jenis Penelitian	10
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	10
3.3 Rancangan Penelitian	10
3.4 Populasi dan Sampel Penelitian	11
3.4.1 Populasi Penelitian	11
3.4.2 Sampel Penelitian	11
3.4.3 Besar Sampel Penelitian	12
3.5 Variabel Penelitian	12
3.5.1 Variabel Bebas	12
3.5.2 Variabel Terikat	12
3.5.3 Variabel Terkendali	13
3.6 Definisi Operasional	13
3.7 Alat dan Bahan Penelitian	13
3.7.1 Alat Penelitian	13
3.7.2 Bahan Penelitian	14
3.8 Prosedur Penelitian	15
3.8.1 Pembuatan Ekstrak Etanolik <i>A. tuberosum</i>	15
3.8.2 Uji Kromatografi Lapis Tipis	16
3.8.3 Perawatan Tikus sebagai Hewan Coba	16
3.8.4 Perlakuan Hewan Coba.....	16
3.8.5 Pemeriksaan CD4+ dan CD8+ dengan Metode Flowsitometri.....	17
3.8.6 Pemeriksaan Kadar MDA	19
3.9 Analisis Data	19
3.10 Alur Kerja Penelitian	20
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN	21
4.1 Hasil Penelitian	21
4.1.1 Ekstraksi Bawang Kucai (<i>A. tuberosum</i>)	21
4.1.2 Uji Kromatografi Lapis Tipis	21

4.1.3	Hasil Pengukuran Persentase CD4+	22
4.1.4	Hasil Pengukuran Persentase CD8+	23
4.1.5	Hasil Pengukuran Kadar MDA Serum	24
4.2	Analisis Data	25
4.2.1	Analisis Data Persentase CD4+	25
4.2.2	Analisis Data Persentase CD8+	27
4.2.3	Analisis Data Kadar MDA Serum	27
4.3	Pembahasan	28
BAB 5	KESIMPULAN DAN SARAN	32
5.1	Kesimpulan	32
5.2	Saran	32
DAFTAR PUSTAKA	33
LAMPIRAN	35

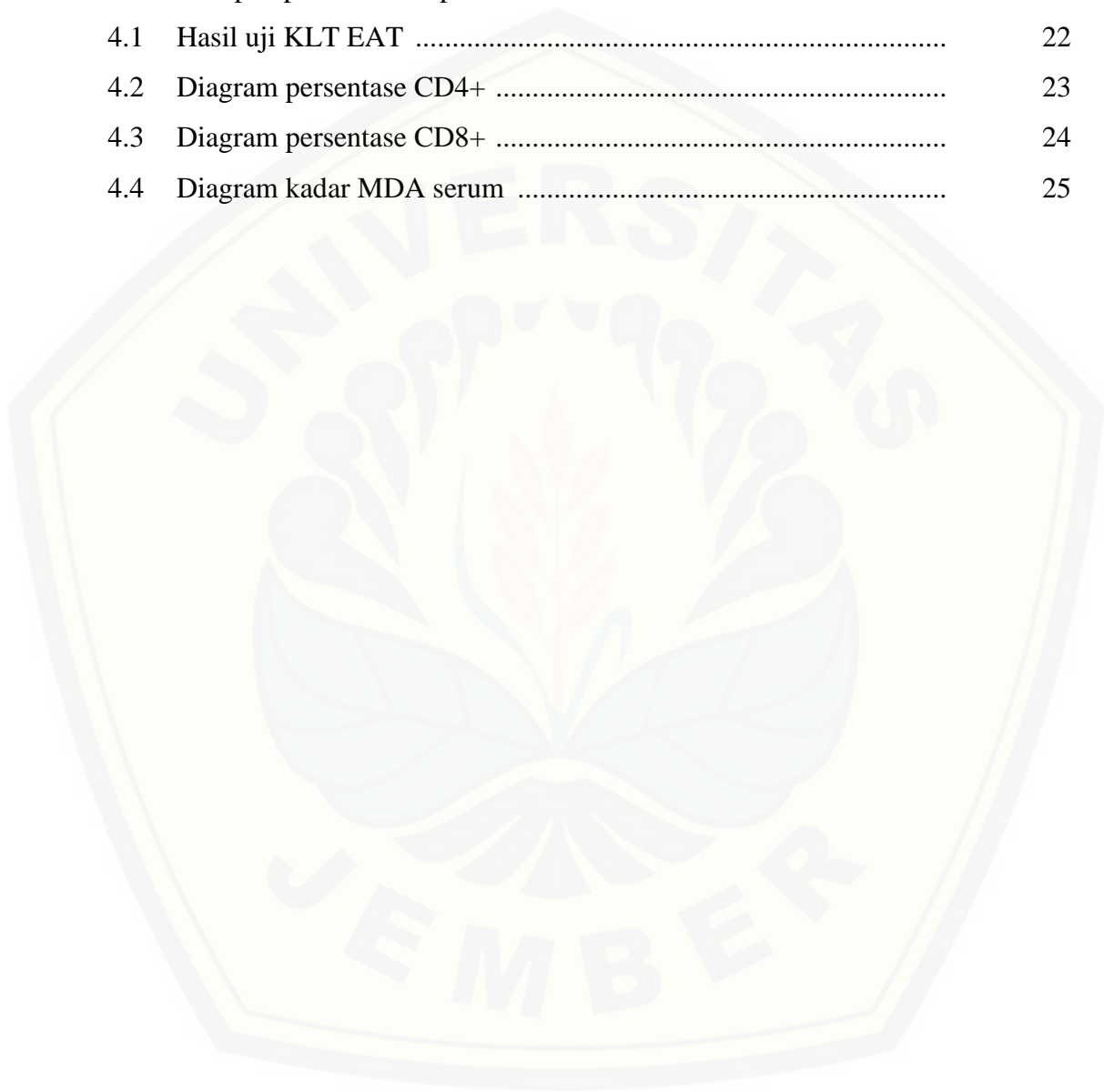
DAFTAR TABEL

	Halaman
3.1 Desain perlakuan hewan coba	17
4.1 Persentase CD4+ sampel penelitian	22
4.2 Persentase CD8+ sampel penelitian	23
4.3 Kadar MDA serum sampel penelitian	24
4.4 Hasil uji <i>Mann-Whitney</i>	26
4.5 Hasil uji <i>post hoc Tuckey</i>	27



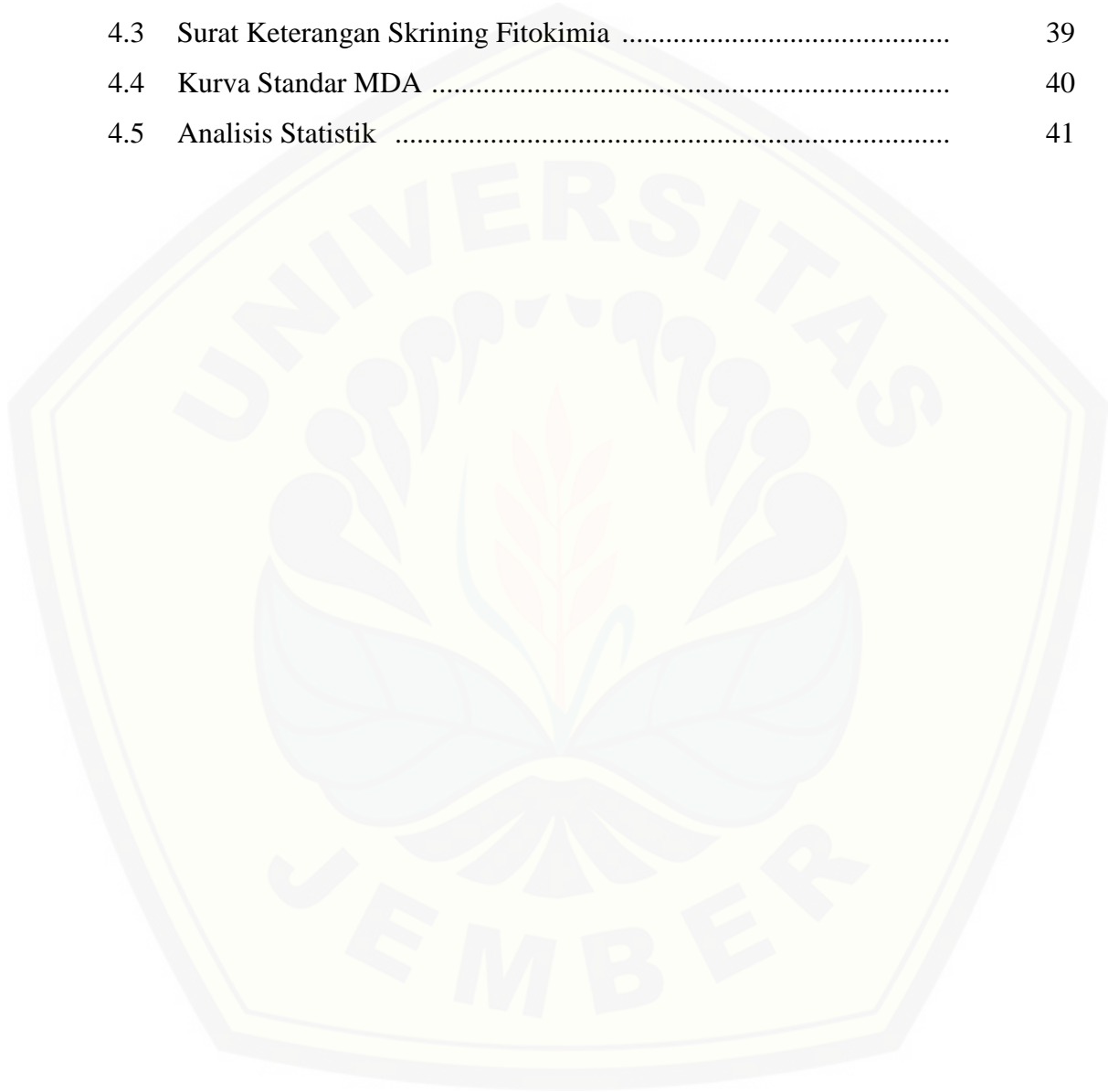
DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Struktur kimia doxorubicin	4
2.2 Tahapan peroksidasi lipid	6
4.1 Hasil uji KLT EAT	22
4.2 Diagram persentase CD4+	23
4.3 Diagram persentase CD8+	24
4.4 Diagram kadar MDA serum	25



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
4.1 Keterangan Persetujuan Etik	36
4.2 Surat Keterangan Identifikasi	38
4.3 Surat Keterangan Skrining Fitokimia	39
4.4 Kurva Standar MDA	40
4.5 Analisis Statistik	41



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker masih menjadi salah satu penyebab utama kematian di dunia. Pada tahun 2012, terdapat 14 juta kasus baru dan 8,2 juta kematian yang disebabkan oleh kanker (WHO, 2015). Di Indonesia prevalensi kanker tahun 2013 sebesar 1,4% dan WHO memperkirakan bahwa jumlah kasus baru kanker akan terus meningkat hingga 70% dalam dua dekade ke depan. Tingginya prevalensi dan mortalitas kanker tersebut mendorong untuk terus dikembangkannya terapi yang efektif dengan efek samping minimal.

Hingga saat ini telah banyak metode terapi kanker yang digunakan, antara lain kemoterapi, radioterapi, bedah, terapi hormon, dll. Kemoterapi atau penggunaan bahan kimia sebagai terapi kanker yang banyak digunakan salah satunya ialah doxorubicin. Obat dari golongan antrasiklin ini terbukti efektif dalam mengobati berbagai jenis kanker seperti kanker payudara, paru, prostat, serviks, tulang, dll. (Li *et al.*, 2014), namun doxorubicin memiliki efek samping yang tidak dapat diabaikan, antara lain immunosupresi, kardiotoxik, hepatotoksik, dan nefrotoksik (Chaudhary *et al.*, 2016 dan Mohebbati *et al.*, 2016). Doxorubicin mempengaruhi sistem imun dengan menurunkan ekspresi IL-2, produksi interferon γ , sel *Natural Killer* (NK), proliferasi limfosit, dan rasio CD4+/CD8+ (Zhang *et al.*, 2005a). Penurunan sistem imun diakibatkan adanya pembentukan radikal bebas dan aktivitas peroksidasi lipid. Hal tersebut menyebabkan modifikasi membran sel T limfosit yang mengakibatkan penurunan jumlah ataupun fungsi sel T termasuk CD4+ dan CD8+ (Jeng *et al.*, 2012).

Oleh karena itu, diperlukan regulasi sistem imun dalam melawan efek immunosupresi sekaligus mengatasi sitotoksitas dan mereduksi efek samping doxorubicin. Adjuvan kemoterapi merupakan strategi terapi kanker dengan mengkombinasikan suatu senyawa dengan agen kemoterapi. Senyawa atau obat tersebut akan meningkatkan efikasi terapi sekaligus menurunkan toksisitas agen kemoterapi pasangannya terhadap jaringan normal (Zhang *et al.*, 2005b).

Pemilihan adjuvan kemoterapi dari senyawa alam untuk memodulasi sistem imun merupakan sebuah peluang yang prospektif. Salah satu tanaman yang berpotensi dalam hal ini adalah bawang kucai (*Allium tuberosum*). Daun bawang kucai diketahui memiliki kandungan flavonoid khususnya allicin yang terbukti mampu meningkatkan jumlah CD4+, selain itu ia juga memiliki efek untuk meningkatkan *pro-inflammatory mediators* (IFN- γ , TNF dan NO) (Feng *et al.*, 2012; Song dan Choi, 2016). Flavonoid menunjukkan aktivitas anti-radikal dan *antichelating* yang mampu menurunkan pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS) sehingga tidak terjadi penurunan sistem imun. Berdasarkan pemaparan tersebut, diperlukan adanya penelitian untuk mengetahui potensi *A. tuberosum* sebagai agen imunomodulator. Hal tersebut tertuang dalam karya ilmiah ini yang berjudul “Efek Imunomodulasi Ekstrak Etanolik Bawang Kucai (*Allium tuberosum*) terhadap Kadar CD4+ dan CD8+ Tikus Wistar yang Diinduksi Doxorubicin.”

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah penelitian ini adalah sebagai berikut.

- a. Bagaimana pengaruh EAT terhadap persentase CD4+ dan CD8+ pada tikus Wistar jantan yang diinduksi doxorubicin?
- b. Bagaimana pengaruh EAT terhadap kadar *Malondialdehyde* (MDA) serum tikus Wistar jantan yang diinduksi doxorubicin?

1.3 Tujuan

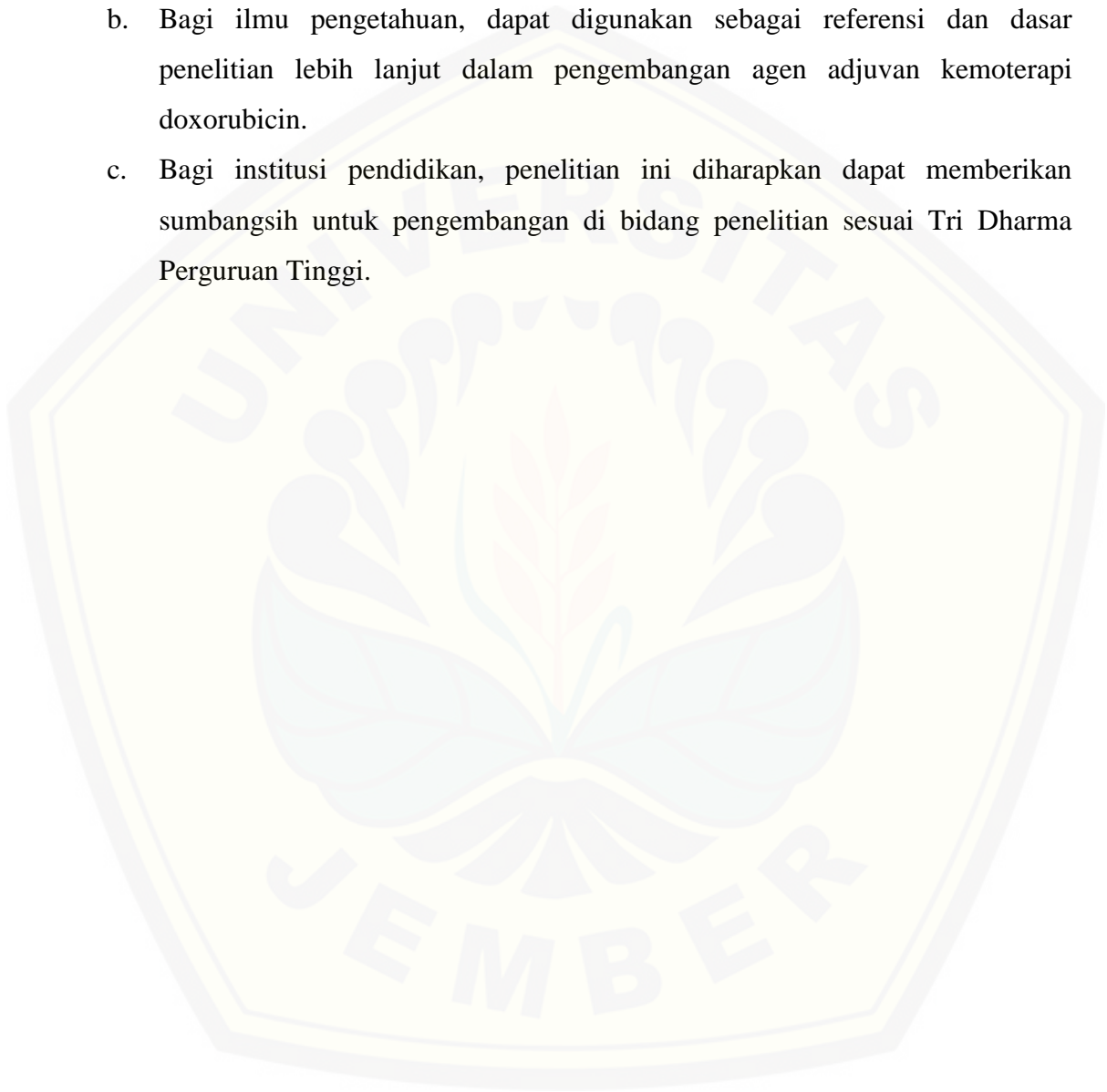
Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

- a. Untuk mengetahui pengaruh EAT terhadap persentase CD4+ dan CD8+ pada tikus Wistar jantan yang diinduksi doxorubicin.
- b. Untuk mengetahui pengaruh EAT terhadap kadar *Malondialdehyde* (MDA) serum tikus Wistar jantan yang diinduksi doxorubicin.

1.4 Manfaat

Manfaat dari penyusunan karya tulis ilmiah ini adalah sebagai berikut.

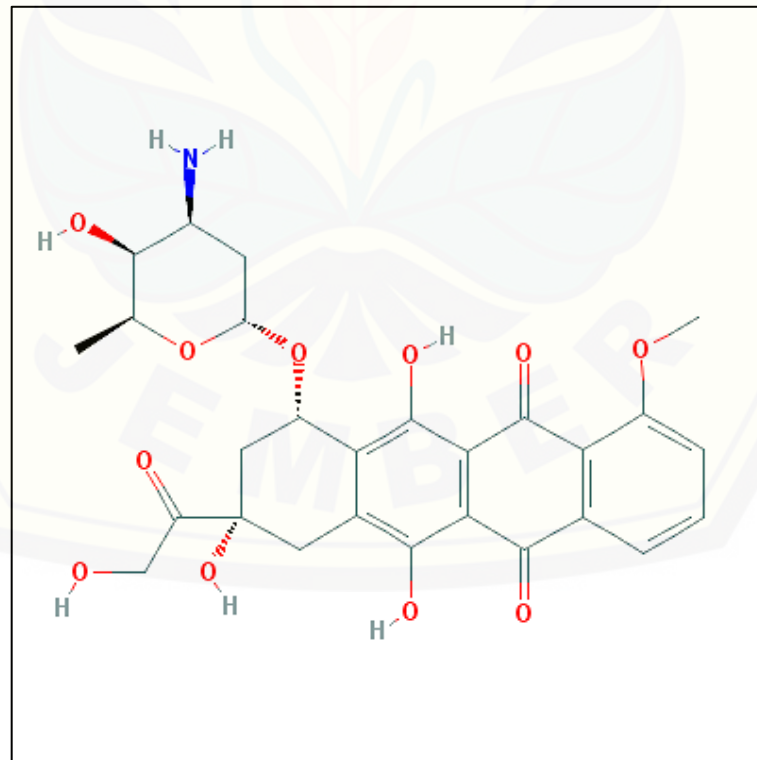
- a. Bagi peneliti, peneliti dapat membuktikan potensi kombinasi tanaman obat dengan agen kemoterapi sebagai terapi kanker.
- b. Bagi ilmu pengetahuan, dapat digunakan sebagai referensi dan dasar penelitian lebih lanjut dalam pengembangan agen adjuvan kemoterapi doxorubicin.
- c. Bagi institusi pendidikan, penelitian ini diharapkan dapat memberikan sumbangsih untuk pengembangan di bidang penelitian sesuai Tri Dharma Perguruan Tinggi.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Doxorubicin Sebagai Kemoterapi Kanker

Doxorubicin (Adriamisin) merupakan kemoterapi dari golongan antrasiklin. Obat ini telah digunakan sejak lama karena efektivitasnya yang tinggi untuk berbagai jenis kanker antara lain leukemia limfositik akut, leukemia mielositik akut, tumor Wilms, neuroblastoma, sarkoma osteogenik, sarkoma jaringan lunak, karsinoma mammae, dll. Doxorubicin bekerja dengan cara interkalisasi *deoxyribonucleic acid* (DNA) sehingga fungsi DNA sebagai template dan pertukaran *sister chromatid* terganggu yang mengakibatkan DNA putus. Obat golongan antrasiklin ini juga bereaksi dengan sitokrom P₄₅₀ reduktase yang dengan adanya NADPH membentuk zat perantara, kemudian bereaksi dengan oksigen menghasilkan radikal bebas (FK UI, 2012). Struktur kimia doxorubicin dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Struktur kimia doxorubicin (NCBI, 2014)

Sebagai agen kemoterapi, doxorubicin memiliki efek samping seperti immunosupresi, kardiotoxik, hepatotoksik, dan nefrotoksik (Chaudhary *et al.*, 2016; dan Mohebbati *et al.*, 2016). Doxorubicin menurunkan sistem imun dengan menurunkan ekspresi IL-2, produksi interferon γ , sel *Natural Killer* (NK), proliferasi limfosit, dan rasio CD4+/CD8+ (Zhang *et al.*, 2005a). Mekanisme penurunan sistem imun tersebut dimungkinkan akibat adanya radikal bebas dari peroksidasi lipid (Kasianningsih *et al.*, 2011). Hal tersebut menyebabkan modifikasi membran sel T limfosit yang mengakibatkan penurunan jumlah ataupun fungsi sel T termasuk CD4+ dan CD8+ (Jeng *et al.*, 2012). Selain itu, doxorubicin juga menyebabkan kerusakan DNA sumsum tulang dan menginduksi apoptosis siklus limfosit dengan menurunkan sel T dan sel B di limpa, nodus limfa serta timus. Doxorubicin menginduksi pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang mengakibatkan peroksidasi lipid (Nugroho *et al.*, 2012).

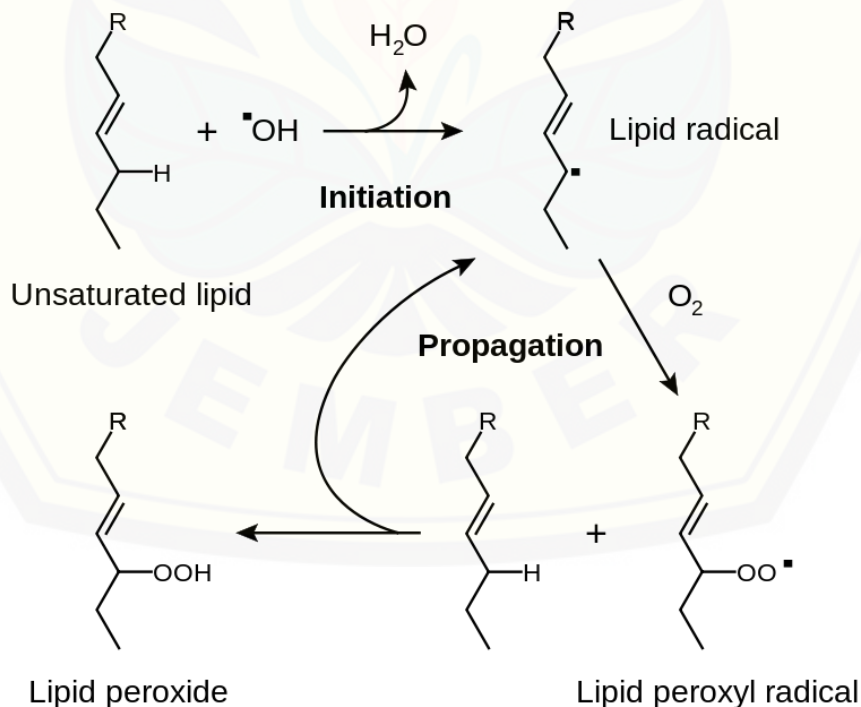
2.2 Peroksidasi Lipid Sebagai Jalur Mekanisme Imunomodulasi CD4+ CD8+

Peroksidasi lipid adalah reaksi berantai yang diinisiasi oleh pengurangan hidrogen atau penambahan oksigen radikal, yang mengakibatkan kerusakan oksidatif dari *Polyunsaturated Fatty Acids* (PUFA). Tahapan peroksidasi lipid dapat dilihat pada Gambar 2.2. Adanya ikatan ganda berdekatan dengan kelompok metilen membuat ikatan metilen C-H yang lemah sehingga lebih mudah mengalami pelepasan hidrogen. Hal ini mengakibatkan adanya sebuah elektron tidak berpasangan pada karbon, membentuk karbon-berpusat radikal, yang distabilkan oleh penyusunan kembali ikatan ganda untuk membentuk *diene* terkonjugasi yang kemudian bergabung dengan oksigen membentuk *peroxyl radical* (RH).

Peroxyl radical mampu melepaskan atom hidrogen dari PUFA lainnya dan memulai reaksi berantai. Molekul oksigen dapat berikatan dengan karbon center radikal (R-) membentuk *lipid peroxyl radicals* (ROO). Dekomposisi peroksida lipid dikatalisis oleh kompleks logam transisi menghasilkan *alcoxyl* (RO-) atau hidroksil (HO-). Pembentukan *peroxyl radical* akan menghasilkan hidroperoksida organik, yang dapat mengurangi hidrogen dari PUFA lain dan reaksi ini disebut

propagasi, yang artinya satu awalan dapat mengakibatkan banyak konversi PUFA menjadi hidroperoksida lipid.

Asam lemak radikal yang dihasilkan distabilkan oleh penataan ulang menjadi *diene* terkonjugasi dalam bentuk yang lebih stabil contohnya lipid hidroperoksida (ROOH). Ion besi seperti Fe^{2+} akan bereaksi dengan ROOH menghasilkan berbagai produk seperti hidroperoksida atau turunan aldehyd yang menghambat sintesis protein. Sementara *hydroxyl radical* yang diperoleh akan mengoksidasi komponen seluler dan membran sel. Hasil akhir dari peroksidasi lipid ini adalah kerusakan struktur membran sel dan pembentukan produk sekunder. Pembentukan produk sekunder seperti *malondialdehyde* (MDA) dapat dijadikan indikator pengukuran peroksidasi lipid. Pengukuran kadar MDA merupakan pengukuran aktivitas radikal bebas secara tidak langsung sebagai indikator stres oksidatif. Pengukuran ini dilakukan dengan tes *Thiobarbituric Acid Reactive Substances* (TBARS) (Repetto *et al.*, 2012).



Gambar 2.2 Tahapan peroksidasi lipid (Young dan McEneny, 2001)

Kerusakan membran sel mengakibatkan toksisitas jaringan di sekitarnya. Dalam hal ini, radikal bebas yang dihasilkan oleh doxorubicin sesuai mekanismenya yang telah dijelaskan sebelumnya akan menyebabkan apoptosis sel T limfosit di limpa, limfa nodi dan timus. CD4⁺ dan CD8⁺ merupakan glikoprotein yang berada di permukaan sel imun seperti sel T helper, sel dendrit, makrofag dll. Kerusakan membran sel T dapat menyebabkan penurunan kadar CD4⁺ dan CD8⁺ (Suarsana *et al.*, 2014).

2.3 Ekstrak Etanolik Bawang Kucai (*A. tuberosum*) Sebagai Imunomodulator

Ekstrak merupakan sediaan pekat dari hasil ekstraksi zat aktif, baik dari simplisia nabati maupun hewani menggunakan pelarut yang sesuai. Ekstraksi merupakan kegiatan penarikan zat yang dapat larut dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Terdapat berbagai macam pelarut yang digunakan sesuai sifat zat yang diinginkan (Ningsih *et al.*, 2009). Penelitian ini menggunakan pelarut etanol karena sifatnya yang mampu melarutkan hampir semua zat, baik bersifat polar, semi polar, maupun non polar. Selain itu pelarut etanol mampu mengendapkan protein dan menghambat kerja enzim sehingga terhindar dari proses hidrolisis dan oksidasi (Arifin *et al.*, 2006). Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah metode maserasi, yaitu dilakukan dengan merendam serbuk simplisia dalam pelarut (cairan panyari). Pelarut akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel, zat aktif yang terkandung dalam rongga sel akan larut dan karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan di dalam sel dan di luar sel, maka larutan yang ada di dalam akan didesak keluar sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di dalam dan di luar sel. Keuntungan cara penyarian dengan metode ini adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah dilakukan (Ningsih *et al.*, 2009).

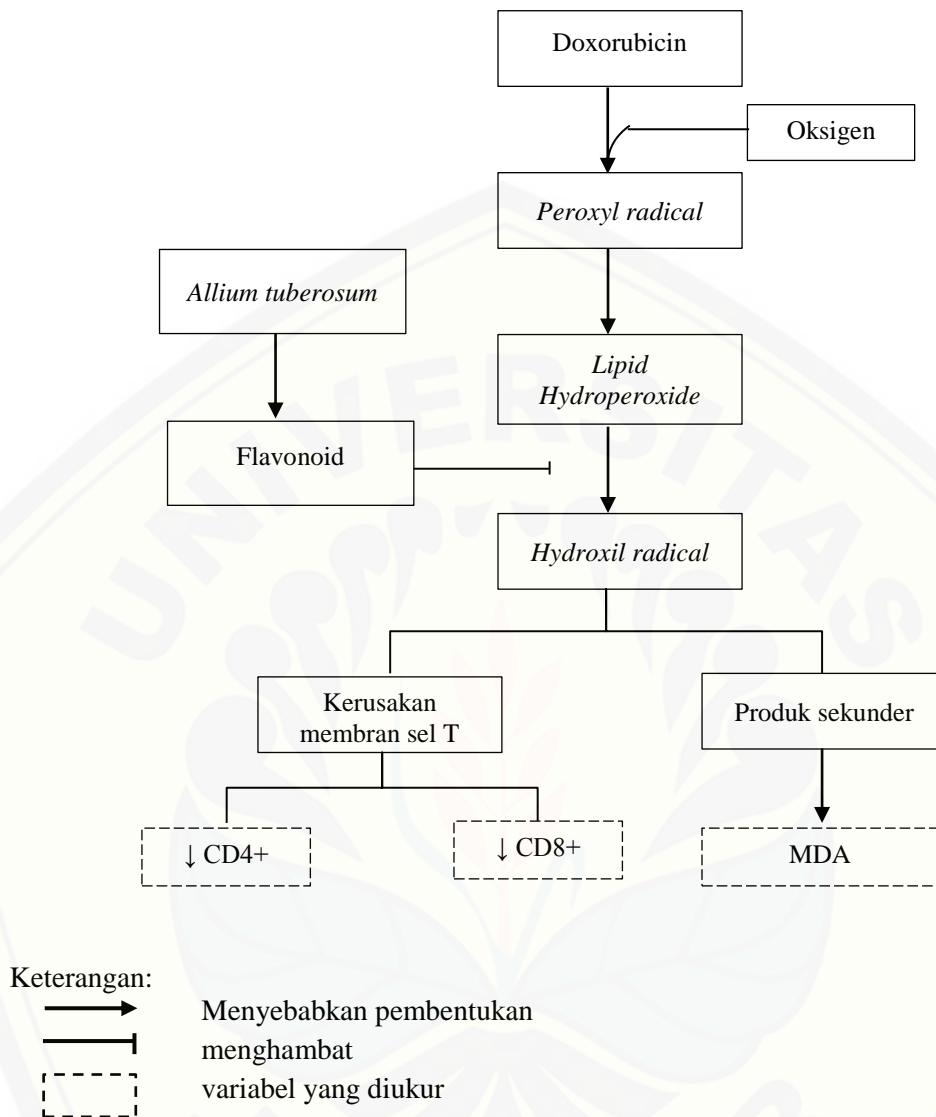
Bawang kucai (*A. tuberosum* Rottl. ex Spreng) merupakan tanaman tahunan yang berasal dari rimpang. Bawang kucai memiliki daun pipih memanjang dan bunganya berwarna putih. Daunnya beraroma tajam dan pekat namun berbeda dengan aroma daun prei (*A. porrum*) maupun daun bawang (*A.*

cepa, *A. fistulosum*, *A. ascalonicum*). Tanaman ini dimanfaatkan sebagai antibakteri, antiemetik, mengatasi inkontinensia urin, kelemahan kandung kemih, dll. (PFAF, 2006). Kandungan fitokimia yang terdapat pada *A. tuberosum* antara lain alkaloid, kandungan fenolik, glikosid, protein, saponin, flavonoid, dll. Taksonomi bawang kucai adalah sebagai berikut (SCM, 2007).

Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)
Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas : Liliopsida (berkeping satu / monokotil)
Sub Kelas : Liliidae
Ordo : Liliales
Famili : Liliaceae (suku bawang-bawangan)
Genus : *Allium*
Spesies : *Allium tuberosum* Rottl. ex Spreng

Bawang kucai memiliki kandungan flavonoid yang cukup tinggi, flavonoid merupakan senyawa aktif yang memiliki kemampuan menurunkan radikal bebas dengan cara menghambat ikatan Fe^{2+} dengan produk peroksidasi lipid sehingga tidak terbentuk hasil akhir yang bersifat toksik bagi membran sel. Hal tersebut menunjukkan potensi bawang kucai sebagai imunomodulator yaitu dalam mencegah penurunan sel imun tubuh (Kasianningsih *et al.*, 2011).

2.4 Kerangka Konsep



2.5 Hipotesis

Hipotesis dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

- Ekstrak etanolik *A. tuberosum* mampu meningkatkan persentase CD4+ dan CD8+ tikus Wistar jantan.
- Ekstrak etanolik *A. tuberosum* mampu menurunkan kadar MDA serum tikus Wistar jantan.

BAB 3. METODE

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimental murni (*true experimental design*).

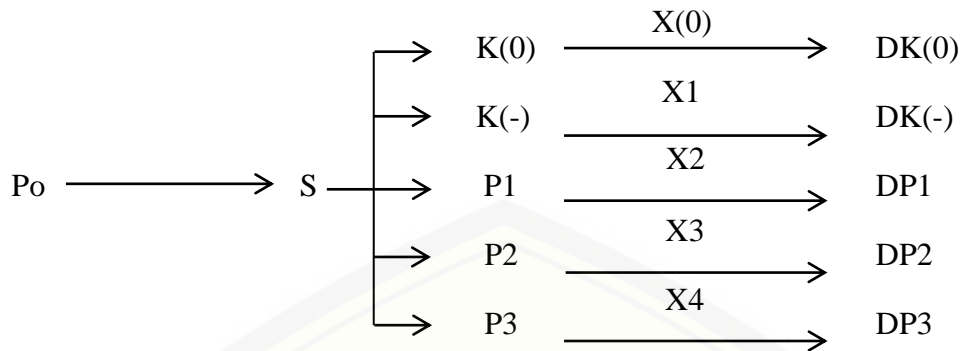
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan dari bulan Oktober hingga November 2016, di beberapa tempat sebagai berikut.

- a. Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember untuk perawatan hewan coba.
- b. Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Jember untuk ekstraksi daun bawang kucai.
- c. Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Jember untuk pemeriksaan MDA.
- d. Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk pemeriksaan flowsitometri.

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *randomized post test only controlled group design*, yaitu suatu desain penelitian di mana pengelompokan sampel dilakukan secara acak dan pengukuran atau pengamatan hanya dilakukan setelah intervensi pada kelompok perlakuan maupun kelompok kontrol. Randomisasi dilakukan untuk mengurangi bias dari sampel yang digunakan. Perlakuan menggunakan EAT hanya diberikan pada kelompok eksperimen, sedangkan kelompok kontrol normal dan kontrol negatif diberi Na-CMC 0,5% per oral. Sebelumnya, semua kelompok kecuali kontrol normal diinduksi doxorubicin. Pengukuran dilakukan pada akhir penelitian yaitu pada hari kelima belas.



Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian

Keterangan:

Po : Populasi

S : Sampel (tikus Wistar jantan)

K0 : Kelompok kontrol normal

K(-) : Kelompok kontrol negatif

P1-3 : Kelompok perlakuan 1, 2, dan 3

X0 : NaCl 0,9% i.p. + Na-CMC 0,5% p.o.

X(-) : Doxorubicin i.p. + Na-CMC 0,5% p.o.

X1 : NaCl 0,9% i.p. + ekstrak *A. tuberosum* 1000 mg/kgBB p.o.X2 : Doxorubicin i.p. + ekstrak *A. tuberosum* 500 mg/kgBB p.o.X3 : Doxorubicin i.p. + ekstrak *A. tuberosum* 1000 mg/kgBB p.o.

DK0 : Data kelompok kontrol normal

DK(-) : Data kelompok kontrol negatif

DP1-3 : Data kelompok perlakuan 1, 2, dan 3

3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

3.4.1 Populasi penelitian

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih galur Wistar.

3.4.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah 25 ekor tikus jantan galur Wistar dengan berat badan 90-150 gram. Selain itu juga dipilih tikus Wistar jantan yang sehat serta

dapat makan dan minum secara normal. Sedangkan kriteria eksklusinya adalah tikus Wistar jantan yang sakit.

3.4.3 Besar Sampel Penelitian

Adapun besar sampel keseluruhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 25 ekor. Dimana 25 ekor tersebut dibagi dalam lima kelompok uji, yang masing-masing terdiri atas lima ekor tikus. Perhitungan besar sampel dihitung dengan rumus Federer sebagai berikut:

$$\begin{aligned} (t - 1) (n - 1) &\geq 15 \\ (5 - 1) (n - 1) &\geq 15 \\ 4n - 4 &\geq 15 \\ 4n &\geq 19 \\ n &\geq 4,75 \approx 5 \end{aligned}$$

Keterangan:

t : jumlah kelompok uji

n : besar sampel per kelompok

Besar sampel ideal menurut hitungan rumus Federer di atas adalah 5 ekor tikus atau lebih per kelompok. Maka jumlah sampel minimal yang digunakan dalam penelitian adalah 25 ekor tikus.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas (*independent variable*)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian EAT dan dosis yang berbeda yaitu 500 dan 1000 mg/kgBB.

3.5.2 Variabel Terikat (*dependent variable*)

Variabel terikat pada penelitian ini adalah persentase CD4+, CD8+, dan kadar MDA serum tikus Wistar jantan yang diinduksi doxorubicin dan diberi EAT maupun kontrol.

3.5.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

- a. Usia tikus yang digunakan dalam penelitian ini adalah 1,5 – 2 bulan.
- b. Jenis kelamin tikus yang digunakan hanya tikus Jantan
- c. Galur yang digunakan adalah galur Wistar

3.6 Definisi Operasional

1. Ekstrak etanolik *A. tuberosum* adalah daun bawang kucai yang diekstrak dengan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70% perbandingan 1:3 selama 5 hari. Daun bawang kucai tersebut berusia 1,5-2 bulan dan diperoleh dari Singosari, Malang.
2. Persentase CD4+ dalam penelitian ini adalah perbandingan jumlah sel CD4+ dengan keseluruhan sel yang diukur menggunakan metode flowsitometri dibaca dengan *BD FACS Calibur* pada *Mode Cell QuestPro*.
3. Persentase CD8+ dalam penelitian ini adalah perbandingan jumlah sel CD8+ dengan keseluruhan sel yang diukur menggunakan metode flowsitometri dibaca dengan *BD FACS Calibur* pada *Mode Cell QuestPro*.
4. Kadar MDA dalam penelitian ini menggunakan serum hewan coba yang diukur dengan metode TBARS secara spektrofotometri pada panjang gelombang 535 nm.
5. Tikus Wistar dalam penelitian ini adalah tikus jantan berusia 1,5-2 bulan dengan berat 90-150 gram dan diperoleh dari kota Malang.
6. Imunomodulasi dalam penelitian ini adalah respon imun akibat substansi yang mempengaruhi, dapat berupa peningkatan atau penurunan respon imun. Efek imunomodulasi tersebut diketahui melalui persentase CD4+ dan CD8+ yang diukur.

3.7 Alat dan Bahan Penelitian

3.7.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain sebagai berikut:

- a. oven, untuk mengeringkan daun *A. tuberosum* sebelum diekstrak;

- b. blender (Panasonic), untuk menghaluskan dan mendapatkan bentukan serbuk dari daun *A. tuberosum* kering;
- c. neraca digital (Pioneer), untuk menimbang berat ekstrak *A. tuberosum* setiap kali diperlukan;
- d. gelas beker 1000 mL (Pyrex), sebagai wadah maserasi *A. tuberosum*;
- e. corong kaca (Pyrex), sebagai alat untuk membantu memindahkan filtrat;
- f. *rotatory evaporator* (Laborota 4000), untuk menguapkan pelarut dan memekatkan ekstrak;
- g. kandang uji, sebagai tempat tinggal tikus selama perlakuan;
- h. wadah minum tikus, untuk memberi minum hewan coba selama perlakuan;
- i. spuit 1 cc (OneMed), untuk menginjeksikan NaCl 0,9% atau doxorubicin;
- j. sonde, untuk memberikan EAT atau Na-CMC 0,5% per oral pada hewan coba;
- k. skalpel, membedah hewan coba untuk mengambil limpa;
- l. pot organ, untuk menyimpan limpa beberapa saat sebelum preparasi sampel;
- m. *petri dish*, tempat untuk melakukan penggerusan limpa;
- n. vortex (VM-300, Axiom, Jerman), untuk menghomogenkan campuran;
- o. sentrifuse (Mega 17R, Hanil Science Industrial, Korea), untuk memisahkan filtrat dan supernatan berdasarkan berat molekul;
- p. mikropipet (Physiocare), untuk mengambil atau memindahkan sampel dengan volume kecil;
- q. eppendorf, untuk menyimpan sampel;
- r. *cell Stainer*, untuk menyaring suspensi limpa;
- s. spektrofotometer (Thermo Scientific Genesys 20 Cat # GY-02650-21)
- t. stopwatch, untuk menghitung waktu setiap diperlukan; dan
- u. daftar isian, untuk mencatat hasil pengamatan.

3.7.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain sebagai berikut:

- a. ekstrak etanol *A. tuberosum*, yang terbuat dari simplisia daun bawang kucai dan etanol 70%;

- b. Na-CMC 0,5%;
- c. Aquades (P.T Nusa Indah Megah, Surabaya);
- d. Doxorubicin (Actavis, PT Actavis Indonesia, Bogor);
- e. tikus Wistar jantan;
- f. pellet tikus;
- g. NaCl 0,9% (P.T Widatra Bhakti, Malang);
- h. Kloroform (Emsure);
- i. *Cell Staining Buffer* (CSB);
- j. *Red Blood Lysis Buffer*;
- k. *Phosphat Buffer Saline* (PBS);
- l. *staining solution* (FITC *anti mouse* CD4 dan PE *anti mouse* CD8 Biolegend);
dan
- m. *Fetal Bovine Serum* (FBS).

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Pembuatan Ekstrak Etanolik *A. tuberosum*

Tahap awal dari penelitian ini adalah pengumpulan bahan uji berupa daun *A. tuberosum* dan determinasi dilakukan di Laboratorium Botani Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Jember. Daun dibersihkan dengan cara dicuci dengan air kemudian dikeringkan pada ruang terbuka tanpa terkena sinar matahari secara langsung. Setelah kering, kemudian diblender untuk mendapatkan ukuran serbuk yang homogen.

Penyarian dilakukan dengan pelarut etanol 70% (1:3) v/v dengan dua kali maserasi. Maserasi pertama dilakukan dengan merendam serbuk simplisia dalam etanol 70% selama 5 hari. Kemudian filtrat I yang diperoleh dikumpulkan dan residu dimaserasi kembali dengan sisa pelarut selama 3 hari, terlindung dari cahaya, dengan sesekali digojog. Filtrat II yang diperoleh dicampur dengan filtrat I, kemudian dievaporasi dengan *rotary evaporator* dengan suhu 60 °C, kecepatan 90 rpm, dan tekanan *vacuum* 0,4-0,5 kPa, sehingga diperoleh ekstrak kental daun *A. tuberosum* hingga beratnya konstan atau semua etanol 70% hilang.

3.8.2 Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Uji KLT dilakukan secara kualitatif untuk mengetahui adanya kandungan flavonoid. EAT ditotolkan pada plat silika gel 60 F₂₅₄. Dielusi dengan butanol:asam asetat:air = 8:2:10, kemudian dikeringkan dan selanjutnya plat disemprot dengan uap amonia, dikeringkan dan diamati pada cahaya tampak dan UV 366. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya warna kuning pada cahaya tampak dan warna biru pada UV 366 (Marliana *et al.*, 2005).

3.8.3 Perawatan Tikus sebagai Hewan Coba

Tikus (*Rattus norvegicus*) Wistar jantan usia 1,5-2 bulan, berat badan sekitar 90-150 gram ditempatkan dalam kandang terpisah dengan suhu 28-32 °C, kelembaban nisbi 98% dan cahaya diatur dengan 12 jam terang dan 12 jam gelap dalam ruangan berventilasi cukup. Pakan tikus berupa pellet dan minum dari air ledeng yang masing-masing diberikan secara *ad libitum*. Tikus diadaptasikan di kandang percobaan selama satu minggu sebelum diberi perlakuan.

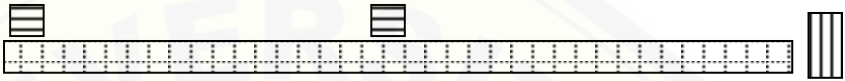
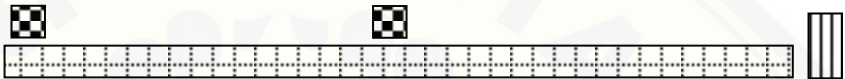



3.8.4 Perlakuan Hewan Coba







Hewan coba dikelompokkan menjadi lima kelompok, yaitu kelompok kontrol normal, kontrol negatif, dan perlakuan 1-3. Jumlah masing-masing tikus pada tiap kelompok adalah lima ekor seperti pada Tabel 3.1. Semua kelompok diberi perlakuan selama 14 hari sebagai berikut.

- a. Kontrol normal, diberikan larutan NaCl 0,9% i.p. pada hari pertama dan kedelapan. Diberikan Na-CMC 0,5% p.o. pada hari ke 1-14.
- b. Kontrol negatif, diberikan Doxorubicin i.p dengan dosis 4,67 mg/ kgBB i.p pada hari pertama dan kedelapan. Diberikan Na-CMC 0,5% p.o. pada hari ke 1-14.
- c. Perlakuan 1, diberikan NaCl 0,9% i.p pada hari pertama dan kedelapan. Diberikan EAT p.o pada hari ke 1-14 dengan dosis 1000 mg/kgBB.
- d. Perlakuan 2, diberikan Doxorubicin i.p dengan dosis 4,67 mg/ kgBB i.p. pada hari pertama dan kedelapan. Diberi ekstrak etanol *A. tuberosum* p.o. pada hari ke 1-14 dengan dosis 500 mg/kgBB.

- e. Perlakuan 3, diberikan Doxorubicin i.p dengan dosis 4,67 mg/kgBB i.p. pada hari pertama dan kedelapan. Diberi ekstrak etanol *A. tuberosum* p.o. pada hari ke 1-14 dengan dosis 1000 mg/kgBB.

Tabel 3.1 Desain perlakuan hewan coba

	Hari ke-														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
K(0)															
K(-)															
P1															
P2															
P3															

-  NaCl 0,9% i.p.
-  Doxorubicin 4,67 mg/kgBB i.p.
-  EAT 500 mg/kgBB p.o.
-  EAT 1000 mg/kgBB p.o.
-  Na-CMC 0,5% p.o.
-  Terminasi

3.8.5 Pemeriksaan CD4+ dan CD8+ dengan Metode Flowsitometri

Pemeriksaan CD4+ dan CD8+ dilakukan dengan prosedur sebagai berikut:

- a. melakukan anestesi tikus dengan kloroform;
- b. membedah tikus dan mengambil organ limpanya;

- c. memasukkan limpa ke dalam cawan petri yang telah diisi dengan 2 mL *Cell Staining Buffer*;
- d. melakukan penggerusan dengan lembut dan perlahan hingga limpa terekstraksi sempurna;
- e. memindahkan suspensi tersebut dengan pipet, melewatkannya di atas *Cell Strainer* dan menampung hasil pada tabung sentrifuse 50 mL;
- f. memindahkan tumpungan sel tersebut ke dalam tabung 1,5 mL;
- g. melakukan sentrifuse pada 5.000 rpm, 4 °C, selama 5 menit;
- h. membuang supernatan lalu menambahkan 1 mL *Red Blood Cell Lysis Buffer* ke dalam pellet sampel;
- i. homogenisasi dengan vortex;
- j. melakukan sentrifuse pada 5.000 rpm, 4 °C, selama 5 menit;
- k. membuang supernatan lalu cuci pellet dengan 1 mL *Phosphat Buffer Saline* (PBS);
- l. melakukan sentrifuse pada 5.000 rpm, 4 °C, selama 5 menit;
- m. membuang supernatan lalu cuci sekali lagi dengan 1 mL PBS;
- n. melakukan sentrifuse pada 5.000 rpm, 4 °C, selama 5 menit;
- o. membuang supernatan lalu memipet 50 µL suspensi pellet sampel dan dimasukkan dalam tabung 1,5 mL baru;
- p. membuat *Staining solution* yang terdiri dari campuran antibodi FITC *anti mouse* CD4 dan PE *anti mouse* CD8 dalam *Cell Staining Buffer* dengan perbandingan 1:100;
- q. menambahkan 50 µL *Staining solution* ke dalam 50 µL suspensi sampel di atas, melakukan pipetting hingga homogen, kemudian diinkubasi pada *room temperature* dan dalam gelap, selama 20-30 menit;
- r. setelah inkubasi selesai, menambahkan 350 µL *Cell Staining Buffer* kemudian memindahkan suspensi sampel ke dalam kuvet baca; dan
- s. segera melakukan analisis flowsitometri dengan *BD FACS Calibur* pada *Mode Cell QuestPro*.

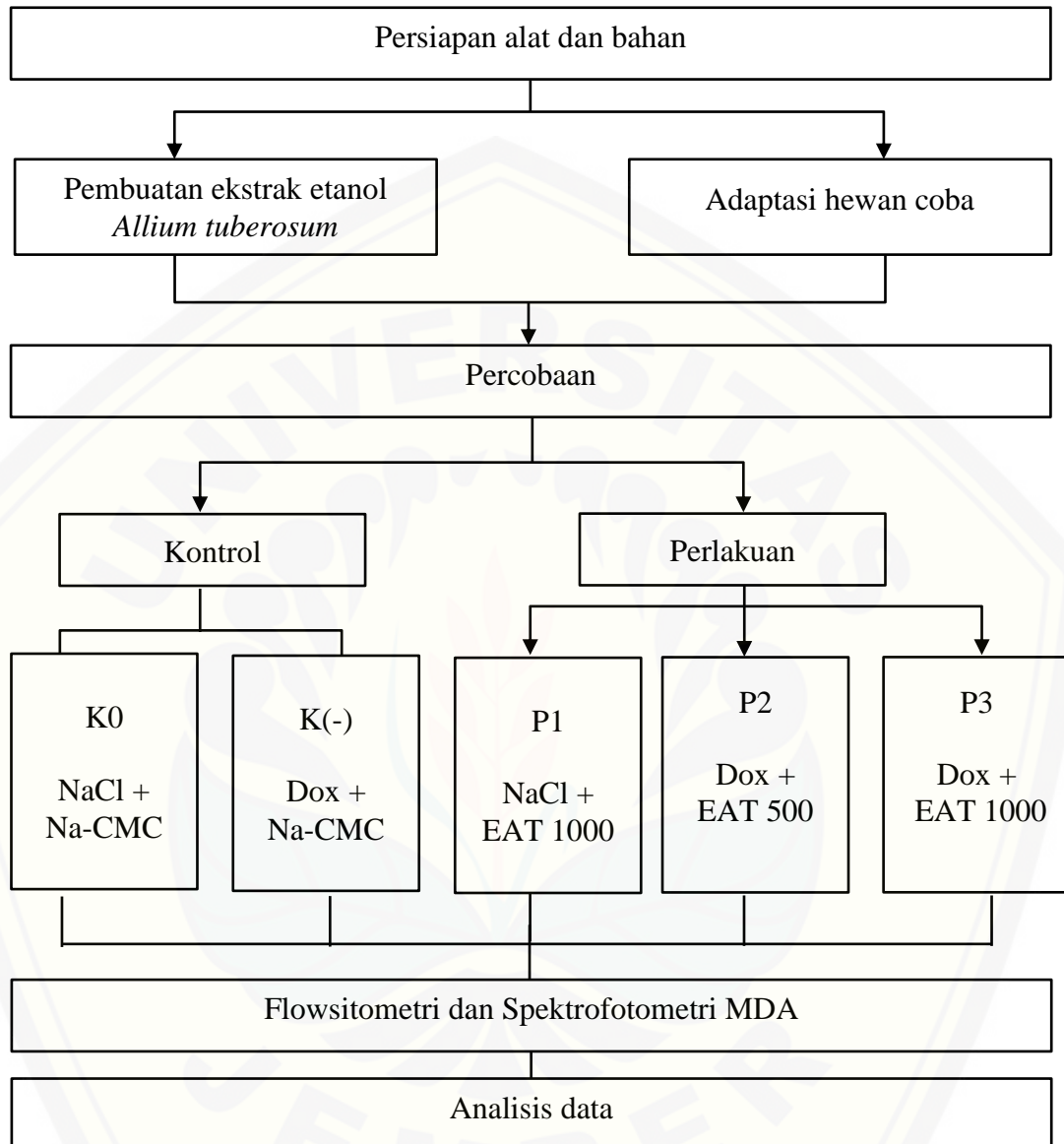
3.8.6 Pemeriksaan Kadar MDA

Pengambilan data dilakukan dengan mengukur kadar malondialdehid serum darah. Masing-masing sampel dan standar disiapkan sebanyak 200 μL pada tabung eppendorf. Kemudian ditambahkan TBA sebanyak 200 μL , divortex dan diinkubasi pada suhu 100 $^{\circ}\text{C}$ selama 60 menit. Setelah didinginkan pada suhu ruang, masing-masing tabung divortex kembali dan disentrifuse. Diambil 100 μl sampel untuk dibaca pada panjang gelombang 535 nm (Bioassay, 2016).

3.9 Analisis Data

Data yang diperoleh kemudian dianalisis statistik untuk menyimpulkan hasil eksperimen. Analisis yang dilakukan adalah uji normalitas dan uji varian. Apabila sebaran data normal ($p > 0,05$) maka digunakan uji hipotesis *one way anova* yang dilanjutkan dengan uji *post hoc Tuckey*. Jika persebaran data tidak normal ($p < 0,05$) maka digunakan uji *Kruskal Wallis* yang dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui apakah ada perbedaan yang bermakna dalam tiap kelompok. Dikatakan bermakna apabila nilai signifikansi $p < 0,05$.

3.10 Alur Kerja Penelitian



BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan, dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanolik bawang kucai (*A. tuberosum*) mempunyai efek imunostimulan terhadap persentase CD4⁺ dan CD8⁺ tikus Wistar jantan yang diinduksi doxorubicin. Selain itu, ekstrak etanolik bawang kucai (*A. tuberosum*) juga mempunyai efek antioksidan terhadap kadar MDA serum tikus Wistar jantan yang diinduksi doxorubicin.

5.2 Saran

Saran-saran yang dapat diberikan dari hasil penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk menganalisis kandungan fitokimia ekstrak etanolik bawang kucai secara kuantitatif.
2. Diperlukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan isolat zat aktif bawang kucai sebagai imunostimulan.
3. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui dosis efektif, farmakokinetik, dan farmakodinamik dari ekstrak etanolik bawang kucai.

DAFTAR PUSTAKA

- Alessandra, L., Stefano, F., Gaetano, B., dan Salvatore, S. 2007. Long-term follow-up of patients with doxorubicin-induced cardiac toxicity after chemotherapy for osteosarcoma. *Anti Cancer Drugs*. 18(6): 737-744.
- Arifin, H., Anggraini, N., Handayani, D., dan Rasyid, R. 2006. Standarisasi ekstrak etanol daun *Eugenia cumini Merr.* *J Sains Tek Fa*, 11(2): 88-93.
- Bennett, S. J. dan Griffiths, H.R. 2013. *Regulation of T-cell Functions by Oxidative Stress*. Dalam *Studies on Arthritis and Joint Disorders*. Editor M. J. Alcaraz. Birmingham: Humana Press.
- Bioassay System. 2016. Quantitative Determination of Thiobarbituric Acid. <https://www.bioassaysys.com/Datasheet/DTBA.pdf>. [Diakses pada 07 Juli 2016].
- Chaudhary, D., Khatiwada, S., Sah, S. K., Tamang, M. K., Bhattacharya, S, dan Jha, C. B. 2016. Effect of doxorubicin on histomorphology of liver of wistar albino rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 4: 186-190.
- Dahlan, M. S. 2016. *Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan Seri 1 Edisi 6*. Jakarta: Epidemiologi Indonesia.
- Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. 2012. *Farmakologi dan Terapi Edisi 5 (Cetak Ulang dengan Tambahan 2012)*. Jakarta: Badan Penerbit FKUI.
- Feng, Y., Zhu, X., Wang, Q., Jiang, Y., Shang, H., Cu, L., dan Cao, Y. 2012. Allicin enhances host pro-inflammatory immune responses and protects against acute murine malaria infection. *Malaria Journal*. 11(1): 268-276.
- Gordon, M. 1990. *The Mechanism of Antioxidant Action in Vitro*. Dalam *Food Antioxidant*. Editor F. Hudson. London: Elsevier Applied Science.
- Huang, H. Y., Chang, C. K., Tso, T. K., Huang, J. J., Chang, W. W., dan Tsai, Y. C. 2004. Antioxidant activities of various fruits and vegetables produced in Taiwan. *Int J Food Sci Nutr*. 55(5): 423-429.
- Jeng, H. A., Pan, C.H., Diawara, N., Chang-Chien, G., Lin, W., Huang, C., Ho, C., dan Wu, M. 2012. Polycyclic aromatic hydrocarbon-induced oxidative stress and lipid peroxidation in relation to immunological alteration. *Occup Environ Med*. 68: 653-658.
- Kasianningsih, S., Rivanti, E., Pratama, R. H., Pratama, N. R., Ikawati, M., dan Meiyanto, E. 2011. *Taraxacum officinale* leaves ethanolic extract as

- immunostimulatory agent for reducing side effect of doxorubicin in sprague dawley rats. *IJCC*. 2(1): 135-140.
- Li, M., Tang, Z., Lv, S., Song, W., Hong, H., Jing, X., Zhang, Y., dan Chen, X. 2014. Cisplatin crosslinked ph sensitive nanoparticles for efficient delivery of doxorubicin. *Biomaterials*. 35: 3851-3864.
- Marliana, D., Suryanti, V., dan Suyono. 2005. Skrining fitokimia dan analisis kromatografi lapis tipis komponen kimia buah labu siam (*sechium edule jacq. swartz.*) dalam ekstrak etanol. *Biofarmasi*. 3(1): 26-31.
- Mohebbati, R., Abbsnezhad, A., Khajavi, R. A., Mousavi, S.M., dan Haghshenas, M. 2016. Effect of hydroalcoholic extract of *nigella sativa* on doxorubicin-induced functional damage of kidney in rats. *Horizon Med Sci*. 22(1): 13-20.
- National Center for Biotechnology Information. 2014. Doxorubicin. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/doxorubicin#section=Top>. [Diakses pada 06 September 2016].
- Ningsih, Nuri, Puspita, dan Amrun. 2009. *Buku Petunjuk Praktikum Fitokima*. Edisi Revisi IV. Jember: Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- Nugroho, A. E., Hermawan, A., Nastiti, K., Suven, Elisa, P., Hadibrata, T., dan Meiyanto, E. 2012. Immunomodulatory effects of hexane insoluble fraction of *ficus septica burm. f.* in doxorubicin-treated rats. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 13(11): 5758-5790.
- Plant for a Future*. 2006. *Allium tuberosum* - Rottler. ex Spreng. <http://www.pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Allium+tuberosum>. [Diakses pada 06 September 2016].
- Repetto, M., Semprine, J., dan Boveris, A. 2012. *Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implication and Analytical Determination*. NY: Intech Publisher.
- Safi'i, A. 2013. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Dan Fraksifrakasi Daun KUCAI (*Allium tuberosum* Rottl. Ex Spreng) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* Secara in Vitro. *Skripsi*. Bandung: Program Studi Farmasi Universitas Islam Bandung.
- Sani, R. N., Nisa, F. C., Andriani, R. D., dan Maligan, J. M. 2014. Analisis rendemen dan skrining fitokimia ekstrak etanol mikroalga laut *Tetraselmis chuii*. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 2(2): 121-126.

- Saroj, P., Verma, M., Jha, K. K., dan Pal, M. 2012. An overview on immunomodulation. *J Adv Scient Res.* 3(1): 7-12.
- School of Chinese Medicine.* 2007. *Allium tuberosum* Rottl. ex Spreng. http://libproject.hkbu.edu.hk/was40/detail?lang=en&channelid=1288&searchword=herb_id=D00365. [Diakses pada 06 September 2016].
- Sikka, S. C., Rajasckaran, M., dan Hellstrom, W. J. 1995. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *J. Androl.* 16: 464-468.
- Song, W. Y. dan Choi J. H. 2016. Effects of *Oenanthe javanica* and *Allium tuberosum* on lipid content in rats fed a high-fat-high-cholesterol diet *Journal of Life Science.* 26(3): 302-308.
- Suarsana, I. N, Astawa, I. N. M., dan Kardena, I. M. 2014. Role of isoflavones on lipid peroxidation, superoxide dismutase in lymphocytes under oxidative stress conditions. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare.* 4(12): 1-8.
- Sultana, F dan Mohsin, M. 2014. Nutritional screening of *Allium tuberosum* from western himalayan region of India. *IJSR.* 3(12): 727-731.
- Tacar, O., Sriamornsak, P., dan Dass, C. R. 2012. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacolog.* 65: 157-170.
- World Health Organization.* 2015. Cancer. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. [Diakses pada 08 Juni 2016].
- Young, I.S. dan McEnemy, J. 2001. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans.* 29(2): 358-362.
- Zhang, X., Li, W. G., Wu, Y. J., dan Gao, M. T. 2005a. Amelioration of doxorubicin-induced myocardial oxidative stress and immuosuppression by grape seed proanthocyanidins in tumour-bearing mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 57(8): 1043-1051.
- Zhang, X., Li, W., Wu, Y., Zheng, T., Li, W., Qu, S., dan Liu, N.. 2005b. Proanthocyanidin from grape seeds potentiates anti-tumor activity of doxorubicin via immunomodulatory mechanism. *International Immunopharmacology.* 5(7-8): 1247-1257.

LAMPIRAN

LAMPIRAN 4.1 KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
KOMISI ETIK PENELITIAN
Jl. Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877 Jember 68121 – Email :
fk_unej@telkom.net

KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK

ETHICAL APPROVA

Nomor : 97^a /H25.1.11/KE/2016

Komisi Etik, Fakultas Kedokteran Universitas Jember dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul :

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Jember University, With regards of the protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled :

EFEK IMUNOMODULASI EKSTRAK ETANOLIK BAWANG KUCAI (*Allium tuberosum*) TERHADAP KADAR CD4+ DAN CD8+ TIKUS WISTAR YANG DIINDUKSI DOXORUBICIN

Nama Peneliti Utama : Kyki Martha Ariesaka (NIM. 132010101080)
Name of the principal investigator

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Name of institution

Dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.
And approved the above mentioned proposal.

Jember, 12 Okt 2016

dr. Rini Riyanti, Sp.PK

Tanggapan Anggota Komisi Etik

Diisi oleh Anggota Komisi Etik, berisi tanggapan sesuai dengan butir-butir isian diatas dan telaah terhadap Protokol maupun dokumen kelengkapan lain.

Saran Komisi Etik :

- Pemilihan, perawatan, perlakuan, pengorbanan dan pemusnahan hewan coba mengacu pada Pedoman Etik Penelitian Kesehatan.
- Mohon diperhatikan kontrol kualitas pembuatan ekstrak etanol bawang Kucai agar didapatkan kadar yang diinginkan.
- Perlakuan penyodean dan injeksi *intraperitoneal* dilakukan oleh orang yang terampil (dilakukan secara cepat dan tepat agar tidak melukai hewan coba)
- Mohon diperhatikan kalibrasi alat dan kontrol kualitas reagen pada pemeriksaan CD4+, CD8+ dan MDA.
- Mohon diperhatikan pembuangan limbah medis dan limbah B3 agar tidak mencemari lingkungan.

Jember, 12 Oktober 2016



(dr. Rini Riyanti, Sp.PK)

LAMPIRAN 4.2 SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
 Jl. Kalimantan 37 Jember Jawa Timur
 Telp 0331-330225

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASINo. 1091/UN25.1.9/TU/2016

Berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke Herbarium Jemberiense, Laboratorium Botani dan Kultur Jaringan, Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Jember oleh :

Nama : Kiky Martha Arieska
 NIM : 132010101080
 Jur./Fak./PT : F. Kedokteran / Universitas Jember

maka dapat disampaikan hasilnya bahwa spesimen tersebut adalah :

Allium tuberosum Rottler ex Spreng. {Syn. *Allium argyi* H.Lév.; *Allium clarkei* Hook.f.;
Allium roxburghii Kunth; *Allium sulvia* Buch.-Ham. ex D.Don; Family – Amaryllidaceae;
 Vernacular name – Kucai, Bawang Kucai, Daun Kucai (Ind.)}

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 20 April 2016

Mengetahui,
 Pembantu Dekan I,



Drs. Achmad Sjaifullah, M.Sc, Ph.D.
 NIP 195910091986021001

Ketua Laboratorium

Dra. Dwi Setyati, M.Si
 NIP. 19640417199103200

LAMPIRAN 4.3 SURAT KETERANGAN SKRINING FITOKIMIA



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS FARMASI

Jl. Kalimantan 1/2 Kampus Tegal Boto. Telp./ Fax. (0331) 324736 Jember 68121.

SURAT KETERANGAN SKRINING FITOKIMIA

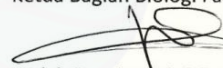
Data pemohon :
 Nama : Ain Y.I
 Fakultas : Kedokteran Universitas Jember
Bahan : Ekstrak jeruk dan daun bawang

Kandungan golongan senyawa :

No.	Sistem yang digunakan	Hasil	Keterangan
1	KLT (Ekstrak jeruk) Fase diam: silica gel 60 F ₂₅₄ Fase gerak: butanol : asam asetat : air (8 : 2 : 10) Deteksi: uap amonia	Terdapat noda dengan warna kuning intensif	Flavonoid (+)
2	KLT (ekstrak daun bawang) Fase diam: silica gel 60 F ₂₅₄ Fase gerak: butanol : asam asetat : air (8 : 2 : 10) Deteksi: uap amonia	Terdapat noda dengan warna kuning intensif	Flavonoid (+)

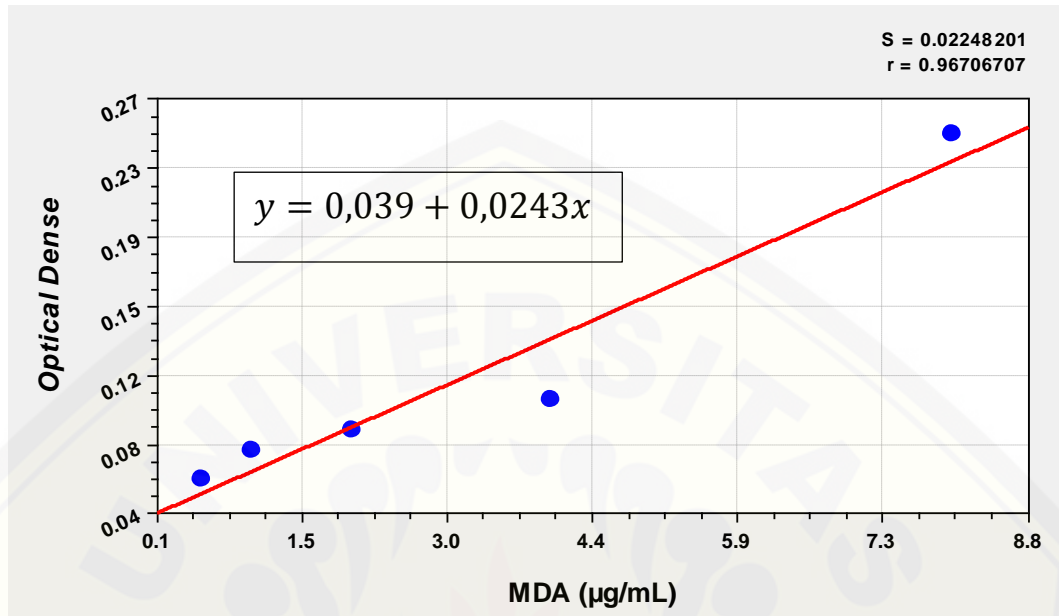
Jember, 23 Juni 2016

Ketua Bagian Biologi Farmasi


Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt.

NIP. 198107232006042002

LAMPIRAN 4.4 KURVA STANDAR MDA



Persamaan kurva:

$$y = a + bx$$

Keterangan: y = nilai absorbansi

x = konsentrasi MDA (µg/mL)

Koefisien a = 0,039

Koefisien B = 0,0243

LAMPIRAN 4.5 ANALISIS STATISTIK

Uji Normalitas CD4+

Tests of Normality

Sampel	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
CD4 K(0)	.244	5	.200 [*]	.811	5	.100
K(-)	.224	5	.200 [*]	.875	5	.286
P1	.257	5	.200 [*]	.818	5	.113
P2	.276	5	.200 [*]	.930	5	.598
P3	.224	5	.200 [*]	.905	5	.437

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Uji Homogenitas CD4+

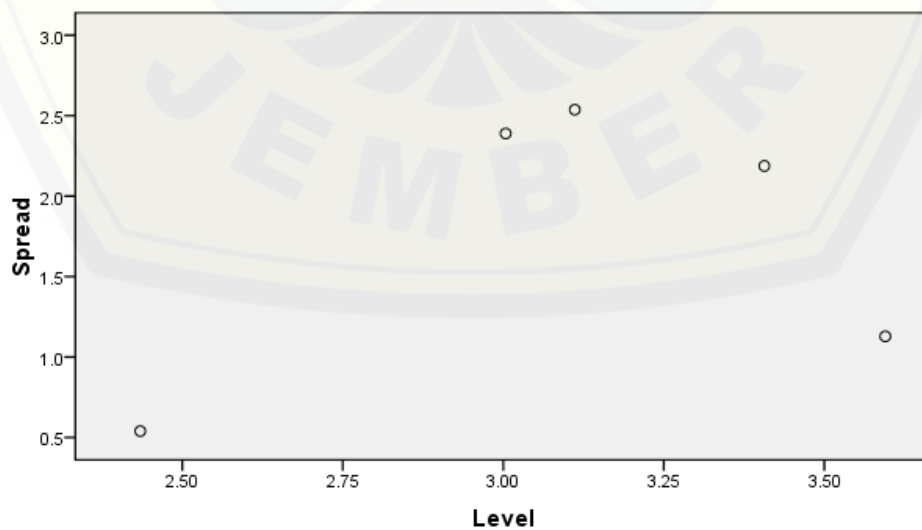
Test of Homogeneity of Variances

CD4

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
7.455	4	20	.001

Slope dan Power untuk Transformasi

Spread vs. Level Plot of CD4 by Sampel



* Plot of LN of Spread vs LN of Level

Slope = .732 Power for transformation = .268

Uji Homogenitas Data Transformasi CD4+

Test of Homogeneity of Variances

trn_CD4

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
9.710	4	20	.000

Uji Kruskal Wallis CD4+

Test Statistics^{a,b}

	CD4
Chi-Square	19.154
df	4
Asymp. Sig.	.001

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:
Sampel

Uji Mann-Whitney

K(0) dan K(-)

Test Statistics^b

	CD4
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	16.000
Z	-2.402
Asymp. Sig. (2-tailed)	.016
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.016 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Sampel

K(0) dan P2

Test Statistics^b

	CD4
Mann-Whitney U	9.000
Wilcoxon W	24.000
Z	-.731
Asymp. Sig. (2-tailed)	.465
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.548 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Sampel

K(0) dan P1

Test Statistics^b

	CD4
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.611
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Sampel

K(0) dan P3

Test Statistics^b

	CD4
Mann-Whitney U	5.000
Wilcoxon W	20.000
Z	-1.567
Asymp. Sig. (2-tailed)	.117
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.151 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Sampel

K(-) dan P1

Test Statistics ^b	
	CD4
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.611
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^a

- a. Not corrected for ties.
b. Grouping Variable: Sampel

P1 dan P2

Test Statistics ^b	
	CD4
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.611
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^a

- a. Not corrected for ties.
b. Grouping Variable: Sampel

K(-) dan P2

Test Statistics ^b	
	CD4
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.611
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^a

- a. Not corrected for ties.
b. Grouping Variable: Sampel

P1 dan P3

Test Statistics ^b	
	CD4
Mann-Whitney U	1.500
Wilcoxon W	16.500
Z	-2.305
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.016 ^a

- a. Not corrected for ties.
b. Grouping Variable: Sampel

K(-) dan P3

Test Statistics ^b	
	CD4
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.611
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^a

- a. Not corrected for ties.
b. Grouping Variable: Sampel

P2 dan P3

Test Statistics ^b	
	CD4
Mann-Whitney U	5.000
Wilcoxon W	20.000
Z	-1.567
Asymp. Sig. (2-tailed)	.117
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.151 ^a

- a. Not corrected for ties.
b. Grouping Variable: Sampel

Uji Normalitas CD8+

Tests of Normality

Sampel	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
CD8 K(0)	.221	5	.200 [*]	.925	5	.564
K(-)	.216	5	.200 [*]	.910	5	.470
P1	.312	5	.125	.837	5	.156
P2	.210	5	.200 [*]	.882	5	.320
P3	.202	5	.200 [*]	.946	5	.711

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Uji Homogenitas CD8+

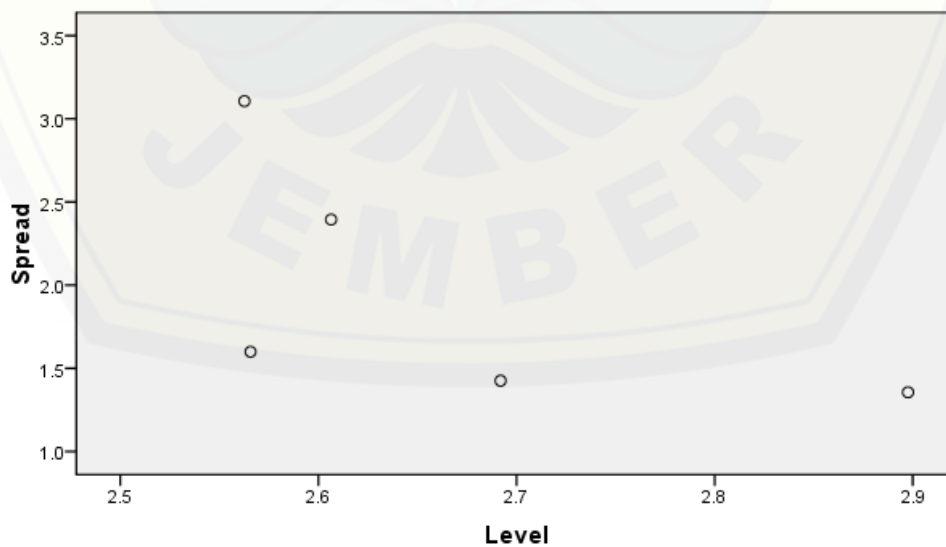
Test of Homogeneity of Variances

CD8

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4.260	4	20	.012

Slope dan Power untuk Transformasi

Spread vs. Level Plot of CD8 by Sampel



* Plot of LN of Spread vs LN of Level

Slope = -3,333 Power for transformation = 4,333

Uji Homogenitas Data Transformasi CD8+

Test of Homogeneity of Variances

trn_CD8

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4.670	4	20	.008

Uji Kruskal Wallis

Test Statistics^{a,b}

	CD8
Chi-Square	4.922
df	4
Asymp. Sig.	.295

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:
Sampel

Uji Normalitas MDA

Tests of Normality

	Sampel	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
MDA	K(0)	.254	5	.200	.927	5	.573
	K(-)	.272	5	.200	.880	5	.307
	P1	.245	5	.200	.900	5	.412
	P2	.264	5	.200	.909	5	.461
	P3	.331	5	.078	.817	5	.111

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Uji Homogenitas MDA

Test of Homogeneity of Variances

MDA

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.847	4	20	.160

Uji One Way ANOVA MDA

ANOVA

MDA	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6.900	4	1.725	49.783	.000
Within Groups	.693	20	.035		
Total	7.593	24			

Uji post hoc Tuckey MDA

Multiple Comparisons

MDA
Tukey HSD

(I) Sampel	(J) Sampel	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K(0)	K(-)	-1.31400 [*]	.11773	.000	-1.6663	-.9617
	P1	.11200	.11773	.873	-.2403	.4643
	P2	-.80000 [*]	.11773	.000	-1.1523	-.4477
	P3	-.44000 [*]	.11773	.010	-.7923	-.0877
K(-)	K(0)	1.31400 [*]	.11773	.000	.9617	1.6663
	P1	1.42600 [*]	.11773	.000	1.0737	1.7783
	P2	.51400 [*]	.11773	.002	.1617	.8663
	P3	.87400 [*]	.11773	.000	.5217	1.2263
P1	K(0)	-.11200	.11773	.873	-.4643	.2403
	K(-)	-1.42600 [*]	.11773	.000	-1.7783	-1.0737
	P2	-.91200 [*]	.11773	.000	-1.2643	-.5597
	P3	-.55200 [*]	.11773	.001	-.9043	-.1997
P2	K(0)	.80000 [*]	.11773	.000	.4477	1.1523
	K(-)	-.51400 [*]	.11773	.002	-.8663	-.1617
	P1	.91200 [*]	.11773	.000	.5597	1.2643
	P3	.36000 [*]	.11773	.044	.0077	.7123
P3	K(0)	.44000 [*]	.11773	.010	.0877	.7923
	K(-)	-.87400 [*]	.11773	.000	-1.2263	-.5217
	P1	.55200 [*]	.11773	.001	.1997	.9043
	P2	-.36000 [*]	.11773	.044	-.7123	-.0077

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.