

Efek Perasan Daun Dan Tangkai Semanggi Air (*Marsilea crenata*) Terhadap Penurunan Kadar Tumor Necrosis

*Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) Dan Interleukin 1 Beta (IL-1 $\beta$ ) Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Urolithiasis*

**SKRIPSI**

Oleh:

**JEFRI HARDYANTO**  
**0911310015**



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN  
PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2013**

Efek Perasan Daun Dan Tangkai Semanggi Air (*Marsilea crenata*) Terhadap Penurunan Kadar Tumor Necrosis

*Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) Dan Interleukin 1 Beta (IL-1 $\beta$ ) Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Urolithiasis*

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

**JEFRI HARDYANTO**  
**0911310015**



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN**  
**PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN**  
**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**  
**MALANG**  
**2013**

## LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Efek Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air (*Marsilea crenata*) Terhadap Penurunan Kadar *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- $\alpha$ ) dan *Interleukin 1 Beta* (IL-1 $\beta$ ) Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Urolithiasis

Oleh:  
**JEFRI HARDYANTO**  
**0911310015**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Pengaji  
pada tanggal 11 September 2013  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

**Prof. Dr. Pratiwi Trisunuwati, drh. MS**

NIP. 19480615 197702 2 001

**Dr. Djoko Winarso, drh., MS**

NIP. 19530605 198403 1 001

Mengetahui,  
Ketua Program Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya

Mengetahui,  
Ketua Program Studi Pendidikan Dokter Hewan  
Program Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya

**Prof. Dr. Pratiwi Trisunuwati, drh. MS**

NIP. 19480615 197702 2 001

**Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES**

NIP. 19600903 198802 2 001

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : JEFRI HARDYANTO

NIM : 0911310015

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul:

Efek Perasan Daun Dan Tangkai Semanggi Air (*Marsilea crenata*) Terhadap Penurunan Kadar *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- $\alpha$ ) Dan *Interleukin 1 Beta* (IL-1 $\beta$ ) Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Urolithiasis

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 18 September 2013  
Yang menyatakan,

**Jefri Hardyanto**  
NIM. 0911310015

Efek Perasan Daun Dan Tangkai Semanggi Air (*Marsilea crenata*) Terhadap Penurunan Kadar *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- $\alpha$ ) Dan *Interleukin 1 Beta* (IL-1 $\beta$ ) Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Urolithiasis

## ABSTRAK

Kasus urolithiasis merupakan masalah utama dalam praktisi veteriner, terutama pada anjing dan kucing. Urolithiasis adalah penyakit akibat pembentukan kristal pada saluran urinaria yang menghambat proses urinasi. Penyakit urolithiasis memicu respon inflamasi secara tidak langsung yang ditandai dengan peningkatan sitokin TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$ . Semanggi air (*Marsilea crenata*) memiliki kandungan flavonoid yang diharapkan berfungsi sebagai antioksidan dan antiinflamasi. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui efek perasan daun dan tangkai semanggi air dapat menghambat urolithiasis yang ditandai dengan penurunan kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) urolithiasis. Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan RAL. Kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  dianalisis statistika menggunakan uji *one way* ANOVA dengan taraf kepercayaan 95% ( $\alpha=0,05$ ) apabila terdapat signifikansi dilanjutkan dengan uji *Tukey* untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan konsentrasi. Induksi urolithiasis menggunakan kombinasi etilen glikol 0,75% dan amonium klorida 2%. Dosis perlakuan perasan daun dan tangkai semanggi dibagi menjadi beberapa konsentrasi, yaitu P3 (5%), P4 (10%), P5 (20%), dan P6 (40%). Induksi urolithiasis dan perlakuan perasan daun dan tangkai semanggi air diberikan secara oral menggunakan sonde lambung selama 10 hari. Variabel yang diamati adalah kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  melalui metode ELISA. Hasil penelitian ini menunjukkan perasan daun dan tangkai semanggi air pada konsentrasi 40% dapat menghambat urolithiasis pada hewan coba tikus putih dibuktikan dengan penurunan kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$ .

**Kata kunci :** Urolithiasis, Semanggi Air, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$

The Effect of Water Clover (*Marsilea crenata*) Leaves and Stalks Juice to Decrease Levels of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) and Interleukin 1 Beta (IL-1 $\beta$ ) in Albino Rat (*Rattus norvegicus*) Urolithiasis

## ABSTRACT

Urolithiasis is major veterinary problem, especially in dogs and cats. Urolithiasis recurrence caused by the formation of crystals in the urinary tract that inhibit the process of urination. Crystal of urolithiasis triggers an inflammatory response characterized by increased cytokines TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels. *Marsilea crenata* contains flavonoids hopefully had function as antioxidant and antiinflammatory. The aim of this study was to determine the effect of *Marsilea crenata* leaves and stalks juice can inhibit urolithiasis evidenced by decrease levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the albino rat urolithiasis. The research design was completely randomized design and true experimental studies. Quantification of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  level were analyzed statistically using one way ANOVA test 95% confidence level ( $\alpha=0,05$ ) continued with Tukey test. Induction of urolithiasis using combination 0.75% ethylene glycol and 2% ammonium chloride. Dose treatment of water clover leaves and stalks juice are divided into several concentrations, P3 (5%), P4 (10%), P5 (20%), and P6 (40%). Induction and treatment of urolithiasis by water clover leaves and stalks juice given orally using a oral gavage for 10 days. The variables measured were levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  using ELISA. The results showed *Marsilea crenata* leaves and stalks juice at a concentrations of 40% can inhibit urolithiasis in the albino rat urolithiasis expression evidenced by decreased levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ .

**Key words :** Urolithiasis, Water clover, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadapan Allah SWT yang melimpahkan rahmat, taufiq, dan hidayah-Nya kepada penulis sehingga skripsi yang berjudul “Efek Perasan Daun Dan Tangkai Semanggi Air (*Marsilea crenata*) Terhadap Penurunan Kadar *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- $\alpha$ ) Dan *Interleukin 1 Beta* (IL-1 $\beta$ ) Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Urolithiasis” ini dapat diselesaikan.

Skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik melalui bantuan berbagai pihak yang terkait. Oleh karena itu, dalam kesempatan kali ini penulis ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Prof. Dr. Pratiwi Trisunuwati drh., MS selaku Ketua Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya, dosen pembimbing akademik penulis, dan dosen pembimbing skripsi I yang bersedia meluangkan waktunya untuk membimbing, membantu, mengarahkan, dan memberikan motivasi kepada penulis selama penyusunan dan penyempurnaan skripsi ini.
2. Prof. Dr. Aulani'am, drh., DESS selaku Ketua Program Studi Pendidikan Dokter Hewan yang selalu memberikan dukungan demi kemajuan Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
3. Dr. Sri Murwani, drh., MP yang telah mengizinkan penulis mengikuti penelitian di bawah penelitian beliau dan sebagai dosen penguji skripsi I yang telah bersedia meluangkan waktunya untuk membimbing dan memberikan kritik dan saran pada penulisan skripsi ini.

4. Dr. Djoko Winarso, drh., MS selaku dosen pembimbing skripsi II yang bersedia membimbing, membantu, mengarahkan, dan memberikan motivasi kepada penulis selama penyusunan proposal dan hasil skripsi.
5. drh. I Dewa Putu Anom Adnyana, M.Vet. selaku dosen penguji skripsi II yang telah bersedia memberikan kritik dan saran pada penulisan skripsi ini.
6. Kedua orang tua penulis (Bapak Drs. Sugiyanto dan Ibu Dyah Mulyani) yang selalu memberikan nasehat, motivasi, doa, dan dukungan kepada penulis.
7. Kakak tersayang drh. Sari Putriani yang selalu membagikan pengalaman berharga dan bermanfaat kepada penulis.
8. Rekan-rekan dalam pelaksanaan penelitian Lelyta, Mardiana, dan Bonanza yang telah berjuang bersama dalam keadaan suka dan duka selama penelitian.
9. Rekan-rekan seperjuangan mahasiswa PKH UB angkatan 2009.
10. Bu Umi, Mas Didin, Mbak Kiki, dan Mas Uki selaku staf Lab. Faal FK UB.
11. Bapak dan Ibu dosen yang telah memberikan banyak ilmu kepada penulis.
12. Bapak dan ibu staf tata usaha PKH UB yang telah melancarkan urusan administrasi skripsi penulis.
13. Semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini tentu jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, kritik dan saran yang sifatnya konstruktif sangat penulis harapkan dari berbagai pihak. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak.

Malang, 18 September 2013

Penulis

**DAFTAR ISI**

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	i
<b>HALAMAN PENGESAHAN .....</b>	ii
<b>HALAMAN PERNYATAAN .....</b>	iii
<b>ABSTRAK .....</b>	iv
<b>ABSTRACT .....</b>	v
<b>KATA PENGANTAR .....</b>	vi
<b>DAFTAR ISI .....</b>	viii
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	x
<b>DAFTAR GAMBAR .....</b>	xi
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	xii
<b>DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG .....</b>	xiii
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	5
2.1 Semanggi Air ( <i>Marsilea crenata</i> ) .....	5
2.1.1 Morfologi Semanggi Air .....	5
2.1.2 Kandungan Gizi Semanggi Air .....	6
2.1.3 Flavonoid Sebagai Antiinflamasi .....	6
2.1.4 Flavonoid Sebagai Antioksidan .....	7
2.2 Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) .....	8
2.3 Urolithiasis .....	9
2.4 Tipe Kristal Urolithiasis .....	10
2.5 Patofisiologi Urolithiasis .....	11
2.5.1 Hubungan Inflamasi dengan Urolithiasis .....	12
2.5.2 <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i> (TNF- $\alpha$ ) .....	13
2.5.3 <i>Interleukin 1 Beta</i> (IL-1 $\beta$ ) .....	13
2.6 Bahan Induksi Urolithiasis .....	14
2.6.1 Etilen Glikol .....	14
2.6.2 Amonium Klorida .....	15
<b>BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL .....</b>	16
3.1 Kerangka Konseptual .....	16
3.2 Hipotesis Penelitian.....	18
<b>BAB 4. METODE PENELITIAN .....</b>	19
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	19
4.2 Alat dan Bahan Penelitian .....	19
4.2.1 Perawatan Hewan Coba .....	19
4.2.2 Pembuatan Perlakuan Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air .....	19
4.2.3 Pembuatan Bahan Induksi Urolithiasis .....	20

4.2.4 Alat Perlakuan Perasan Kepada Hewan Coba .....	20
4.2.5 Pembedahan Tikus .....	20
4.2.6 Pengukuran Kadar TNF- $\alpha$ dan IL-1 $\beta$ Melalui Metode ELISA .....	20
<b>4.3 Tahapan Penelitian .....</b>	<b>20</b>
4.3.1 Penetapan Dosis Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air .	20
4.3.2 Penetapan Sampel Penelitian .....	21
4.3.3 Penetapan Dosis Bahan Induksi Urolithiasis .....	22
4.3.4 Rancangan Penelitian .....	22
4.3.5 Variabel Penelitian .....	23
4.3.6 Analisis Statistika Kadar TNF- $\alpha$ dan IL-1 $\beta$ .....	23
<b>4.4 Prosedur Kerja .....</b>	<b>24</b>
4.4.1 Persiapan Hewan Coba .....	24
4.4.2 Pemilihan Daun dan Tangkai Semanggi Air .....	24
4.4.3 Pembuatan Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air.....	24
4.4.4 Pemberian Perlakuan.....	25
4.4.5 Pengambilan Sampel Serum Darah .....	25
4.4.6 Pengukuran Kadar TNF- $\alpha$ dan IL-1 $\beta$ .....	26
<b>BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>27</b>
5.1 Pengaruh Perlakuan Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air Terhadap Kadar TNF- $\alpha$ .....	27
5.2 Pengaruh Perlakuan Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air Terhadap Kadar IL-1 $\beta$ .....	32
<b>BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>38</b>
6.1 Kesimpulan .....	38
6.2 Saran .....	38
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>39</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>44</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel

Halaman

4.1 Pengamatan hasil penelitian .....	23
4.2 Pembuatan perasan daun dan tangkai semanggi air .....	24
4.3 Pemberian perlakuan .....	25
5.1 Hasil analisis kadar TNF- $\alpha$ .....	27
5.2 Hasil analisis kadar IL-1 $\beta$ .....	32



## DAFTAR GAMBAR

Gambar

Halaman

3.1 Kerangka konseptual .....	16
5.1 Grafik batang kadar TNF- $\alpha$ ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) .....	27
5.2 Grafik batang kadar IL-1 $\beta$ ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) .....	32



**DAFTAR LAMPIRAN**

Lampiran	Halaman
1. Determinasi semanggi air ( <i>Marsilea crenata</i> ) .....	44
2. Sertifikat layak etik penelitian .....	45
3. Surat pernyataan payung penelitian .....	46
4. Uji Bartlett (Uji homogenitas berat badan awal tikus) .....	47
5. Perhitungan dosis bahan induksi urolithiasis .....	49
6. Diagram tahapan penelitian .....	50
7. Berat badan hewan coba selama pemeliharaan .....	51
8. Prosedur pengukuran kadar TNF- $\alpha$ melalui metode ELISA.....	52
9. Prosedur pengukuran kadar IL-1 $\beta$ melalui metode ELISA.....	53
10. Hasil pengukuran kadar TNF- $\alpha$ melalui metode ELISA .....	54
11. Hasil pengukuran kadar IL-1 $\beta$ melalui metode ELISA .....	55
12. Analisis statistik kadar TNF- $\alpha$ menggunakan SPSS 16.....	56
13. Analisis statistik kadar IL-1 $\beta$ menggunakan SPSS 16.....	61
14. Dokumentasi penelitian .....	66

**DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG**Simbol/SingkatanKeterangan

ANOVA

*analysis of variant antigen presenting cell*

APC

berat badan

BB

beda nyata jujur

BNJ

*bovine serum albumin*

BSA

*calcium oxalate*

CaOx

*corn gluten meal*

CGM

*cyclooxygenase 2*

COX2

*crude palm oil*

CPO

*dried distiller grain solubles*

DDGS

*deoxyribonucleic acid*

DNA

*enzyme linked immunosorbent assay*

ELISA

gram

g

asam klorida

HCl

*IkB kinase*

IKK

*interleukin 1 beta*IL-1 $\beta$ *interleukin 6*

IL-6

*IL-1 receptor associated kinase 1*

IRAK1

*IL-1 receptor associated kinase 4*

IRAK4

*mitogen activated protein kinase*

MAPK

miligram

mg

mililiter

ml

milimeter

mm

*nuclear factor kappa B*NF- $\kappa$ B*nuclear related factor 2*

Nrf2

*phosphat buffer saline*

PBS

*poliethylene tereftalat*

PET

per oral

PO

rancangan acak lengkap

RAL

*reactive oxygen species*

ROS

*rad per minute*

rpm

*streptavidin horseradish peroxidase*

SA-HRP

*superoxide dismutase*

SOD

*statistical package for the social sciences*

SPSS

sistem saraf pusat

SSP

*toll like receptor*

TLR

*tetra methyl benzidine*

TMB

*tumor necrosis factor alpha*TNF- $\alpha$ *transforming growth factor b activated kinase*

TRAF6

mikroliter

 $\mu$ l

## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Perkembangan ilmu pengetahuan bidang pengobatan di dunia saat ini mengalami kemajuan pesat seiring dengan kemajuan teknologi, namun adanya kecenderungan pola hidup kembali ke alam (*back to nature*) membuat penggunaan obat herbal digemari oleh masyarakat di Indonesia (Yacoeb, dkk., 2010). Hal tersebut disebabkan obat herbal mempunyai banyak keuntungan, antara lain harga yang relatif murah, praktis dalam pemakaian, bahan baku mudah diperoleh, dan efek samping lebih kecil daripada obat sintetik. Indonesia adalah negara yang memiliki keanekaragaman hayati tanaman yang melimpah namun masih kurangnya tanaman yang dimanfaatkan untuk pengobatan. Salah satu tanaman yang dapat digunakan untuk pengobatan adalah tanaman semanggi air (Nurjanah dan Abdullah, 2012).

Semanggi air (*Marsilea crenata*) merupakan salah satu jenis tumbuhan air yang termasuk dalam paku-pakuan dan banyak ditemukan pada pematang sawah (Johnson, 2011). Kandungan mineral pada daun dan tangkai semanggi air adalah kalium, fosfor, besi, natrium, kalsium, seng, dan tembaga. Semanggi air juga memiliki kandungan fitokimia seperti alkaloid, steroid, flavonoid, karbohidrat, gula pereduksi, dan asam amino. Tanaman ini berkhasiat melancarkan urinasi (diuretik), membantu fungsi ginjal, mencegah osteoporosis, dan melancarkan peredaran darah. Kandungan mineral dan fitokimia yang berfungsi sebagai

melerutkan kristal kalsium oksalat (CaOx) adalah kalium dan flavonoid (Nurjanah dan Abdullah, 2012).

Kasus urolithiasis yang terjadi pada anjing dan kucing merupakan masalah utama dalam bidang praktisi veteriner (Ross, 2005). Urolithiasis menjadi nomor dua di dunia dari semua kasus penyakit saluran urinaria pada hewan kesayangan seperti anjing dan kucing (Sparkes dan Philippe, 2008). Menurut Hesse (2008), angka kejadian pada anjing sekitar 0,5% sampai 1% dari semua populasi anjing di Inggris, sedangkan pada kucing sekitar 0,6% dari semua populasi kucing di Inggris.

Urolithiasis adalah panyakit pada sistem urinaria karena adanya pembentukan dan akumulasi kristal yang menghambat proses urinasi (Lulich dan Osborne, 2007). Prevalensi urolithiasis pada anjing dan kucing meningkat setiap tahunnya (Gisselman, *et al.*, 2009). Hal ini berkaitan dengan diet tinggi protein dan adanya perubahan pola gaya hidup ke modern. Kristal kalsium oksalat (CaOx) adalah tipe kristal yang paling sering terjadi pada anjing dan kucing dengan angka prevalensi 90% (Sparkes dan Philippe, 2008).

Proses pembentukan kristal berasal dari beberapa proses fisiokimia seperti peningkatan eksresi kalsium dan oksalat dalam urin, supersaturasi urin, kristalisasi, agregasi kristal, pertumbuhan kristal, penempelan kristal ke saluran ureter, retensi ureter, dan agglomerasi ureter (Yadav, *et al.*, 2011). Akumulasi kristal di ureter menyebabkan proses urinasi menjadi tersumbat sehingga ureter mengalami inflamasi. Reaksi inflamasi ini direspon oleh makrofag dengan

mensekresi sitokin proinflamasi. Sitokin proinflamasi yang berperan sebagai indikator terjadinya inflamasi adalah sitokin TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$ .

Beberapa penelitian sebelumnya telah dilakukan mengenai pengobatan dan pencegahan urolithiasis dengan menggunakan tanaman lain, seperti daun alpukat (*Persea americana*), asparagus (*Asparagus racemosus*), bunga matahari (*Helianthus annuus*), daun rosella (*Hibiscus sabdariffa*), dan buah ketimun (*Cucumis sativus L.*) (Saputra, 2009; Jagannath, *et al.*, 2012; Khan, *et al.*, 2010; Laikangbam, *et al.*, 2011; Wijaya dan Darsono, 2005). Penelitian tersebut diperoleh bahwa semua jenis tanaman tersebut mempunyai kandungan flavonoid yang berfungsi sebagai antiinflamasi. Namun belum ada penelitian yang dilakukan untuk mempelajari efek antiinflamasi pada semanggi air, sedangkan semanggi air mudah ditemukan di lingkungan sekitar. Penelitian ini difokuskan pada efek antioksidan dan antiinflamasi dari tanaman semanggi air untuk mengamati penurunan kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  pada hewan coba urolithiasis. Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi dengan kombinasi etilen glikol 0,75% dan ammonium klorida 2% sehingga dalam 10 hari akan terbentuk kristal kalsium oksalat (Susilawati, dkk., 2003).

## 1.2 Rumusan Masalah

Apakah perasan daun dan tangkai semanggi air dapat menghambat urolithiasis pada hewan coba tikus putih dibuktikan dengan penurunan kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  ?

#### **1.4 Tujuan**

Untuk mengetahui perasan daun dan tangkai semanggi air dapat menghambat terjadinya urolithiasis pada hewan coba tikus putih dibuktikan dengan penurunan kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$ .

#### **1.5 Manfaat**

Menambah manfaat tentang efek perasan daun dan tangkai semanggi air untuk menghambat terjadinya urolithiasis menggunakan hewan coba tikus putih.



## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Semanggi Air (*Marsilea crenata*)

Semanggi merupakan tanaman air yang banyak terdapat di lingkungan air tawar seperti, sawah, kolam, danau, rawa-rawa, dan sungai. Semanggi air dimanfaatkan oleh masyarakat di Jawa Timur sebagai bahan pangan dan campuran pecel (Champion dan Clayton, 2001).

Klasifikasi semanggi air menurut Steenis (2008) adalah sebagai berikut:

Kingdom	:	Plantae
Subkingdom	:	Tracheobionta
Divisi	:	Pteridophyta
Kelas	:	Pteridopsida
Ordo	:	Marsileales
Famili	:	Marsileaceae
Genus	:	Marsilea
Spesies	:	<i>Marsilea crenata</i>

#### 2.1.1 Morfologi Semanggi Air

Ditinjau dari morfologinya, daun semanggi air berwarna hijau gelap yang setiap tangkai terdiri dari empat helai daun yang lonjong bertepi rata yang pangkalnya runcing dengan panjang daun  $\pm 2,5$  cm dan lebar daun  $\pm 2,3$  cm.

Tangkai semanggi air memiliki panjang sekitar  $\pm 20$  cm dan bagian yang muncul pada permukaan air setinggi  $\pm 3\text{-}4$  cm. Batang semanggi air berupa stolon yang

berwarna hijau kecokelatan. Akar dari semanggi air tertanam dalam substrat di dasar perairan berupa serabut yang berwarna putih (Steenis, 2008).

### 2.1.2 Kandungan Gizi Semanggi Air

Tumbuhan semanggi air memiliki kandungan gizi baik makro maupun mikro. Kandungan gizi makro terdiri dari karbohidrat, protein, dan lemak, sedangkan kandungan gizi mikro terdiri dari vitamin dan mineral. Menurut Arifin (2009), kandungan mineral daun dan tangkai semanggi air (mg/100g) adalah kalium (937,56), fosfor (142,8), besi (108,3), natrium (69,6), kalsium (69,05), seng (7,56), dan tembaga (5,19). Kalium dengan kandungan mineral tertinggi pada daun dan tangkai semanggi air berfungsi sebagai diuretik yang dapat meningkatkan jumlah urin, menghambat terjadinya supersaturasi dan kristalisasi, dan mencegah terjadinya *renal colic pain* (Yadav, *et al.*, 2011).

Semanggi air juga mempunyai kandungan fitokimia yang merupakan senyawa bioaktif dalam tumbuhan dan digunakan dalam pengobatan pada manusia dan hewan (Sirait, 2007). Senyawa fitokimia berperan penting dalam penelitian obat yang dihasilkan dari tumbuhan. Senyawa fitokimia yang terkandung dalam daun dan tangkai semanggi air adalah alkaloid, flavonoid, saponin, karbohidrat, gula pereduksi, dan asam amino (Kristiono, 2009). Dari beberapa senyawa fitokimia tersebut, senyawa flavonid yang paling berperan penting sebagai antiinflamasi untuk mencegah dan mengobati urolithiasis.

### 2.1.3 Flavonoid Sebagai Antiinflamasi

Flavonoid umumnya terdapat pada tumbuhan sebagai glikosida, gugusan gula bersenyawa pada satu atau lebih grup hidroksil fenolik. Flavonoid merupakan

golongan senyawa fenol terbesar sebagai kandungan khas tumbuhan hijau. Flavonoid terdapat pada seluruh bagian tanaman termasuk pada daun, tangkai, dan akar (Kristiono, 2009). Flavonoid berperan dalam menurunkan stres oksidatif akibat manifestasi obstruksi pada ureter. Penurunan stres oksidatif terjadi ketika adanya intervensi *scavenging* dan *depuration* dari *reactive oxygen species* (ROS) sehingga dapat berperan dalam mitigasi kerusakan glomerulus selanjutnya. Penurunan stres oksidatif pada sel glomerular dan sel epitel tubular menyebabkan generasi ROS menurun sehingga *nuclear factor kappa B* (NF- $\kappa$ B) tidak teraktivasi dan makrofag tidak dapat mensekresi sitokin proinflamasi seperti *tumor necrosis factor alpha* (TNF- $\alpha$ ) dan *interleukin 1 beta* (IL-1 $\beta$ ) (Singh, *et al.*, 2006).

#### 2.1.4 Flavonoid Sebagai Antioksidan

Flavonoid termasuk salah satu kelompok senyawa aromatik yang termasuk polifenol dan mengandung antioksidan. Zat antioksidan adalah zat yang sangat mudah teroksidasi oleh udara (oksigen). Flavonoid sebagai antioksidan berperan dalam mengurangi berbagai bentuk ROS sehingga dapat menghambat respon stres oksidatif pada sel dan jaringan (Brunetti, *et al.*, 2013).

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antioksidan dibedakan menjadi tiga, yaitu antioksidan primer, antioksidan sekunder, dan antioksidan tersier. Antioksidan primer berperan untuk mencegah pembentukan radikal bebas baru dengan memutus reaksi berantai dan mengubahnya menjadi produk yang lebih stabil. Contoh dari antioksidan primer adalah enzim *superoxide dismutase* (SOD), enzim katalase, dan enzim *glutation dismutase*. Antioksidan sekunder berfungsi menangkap senyawa radikal bebas dan mencegah terjadinya reaksi berantai.

Contoh dari antioksidan sekunder adalah vitamin E, vitamin C, dan β-karoten.

Antioksidan tersier berfungsi memperbaiki kerusakan sel dan jaringan yang disebabkan oleh radikal bebas. Contoh dari antioksidan tersier adalah enzim-enzim yang berfungsi untuk memperbaiki DNA.

## 2.2 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Hewan laboratorium adalah hewan yang sengaja dipelihara dan diternakkan untuk dipakai sebagai hewan coba guna mempelajari dan mengembangkan berbagai macam bidang ilmu dalam skala penelitian atau pangamatan laboratoris. Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian harus memenuhi kriteria tertentu, antara lain kemiripan fungsi fisiologis dengan manusia dan hewan lainnya, berkembang biak dengan cepat, mudah didapatkan dan dipelihara, dan memiliki galur genetik murni, serta murah secara ekonomis (Koolhaas, 2010).

Tikus putih merupakan strain albino dari *Rattus norvegicus*. Tikus putih memiliki beberapa galur yang merupakan hasil pembiakkan sesama jenis atau persilangan seperti Wistar, Sprague Dawley, Madison, Wicoustin, dan Long Evans. Tikus putih termasuk ke dalam hewan mamalia yang memiliki ekor panjang. Ciri-ciri galur ini yaitu bertubuh panjang dengan kepala lebih sempit. Telinga tikus ini tebal dan pendek dengan rambut halus. Mata tikus putih berwarna merah. Ciri yang paling terlihat adalah ekornya yang panjang. Berat badan tikus jantan pada umur 12 minggu mencapai 240 g, sedangkan betinanya mencapai 200 g. Tikus putih memiliki lama hidup berkisar antara 4-5 tahun

dengan berat badan tikus jantan berkisar antara 267-500 g dan betina 225-325 g (Sirois, 2005).

Klasifikasi tikus putih menurut Sirois (2005) adalah sebagai berikut:

Kingdom	:	Animalia
Filum	:	Chordata
Kelas	:	Mamalia
Ordo	:	Rodentia
Sub Ordo	:	Myomorpha
Famili	:	Muridae
Sub Famili	:	Murinae
Genus	:	Rattus
Spesies	:	<i>Rattus norvegicus</i>

Hewan coba tikus putih telah banyak digunakan sebagai hewan coba urolithiasis, seperti pada penelitian sebelumnya menggunakan hewan coba tikus putih yang diinduksi dengan kombinasi etilen glikol 0,75% dan ammonium klorida 2% untuk menguji efek ekstrak etanol asparagus (*Asparagus racemosus*) sebagai antiurolithiasis (Jagannath, *et al.*, 2012) dan penelitian tentang tikus putih yang diinduksi kombinasi etilen glikol 0,75% dan ammonium klorida 2% untuk menguji efek antilithiasis pada ekstrak bunga matahari (*Helianthus annus*) (Khan, *et al.*, 2010).

### 2.3 Urolithiasis

Urolithiasis adalah penyakit pada sistem urinaria akibat adanya kristal yang terbentuk dan menghambat proses urinasi di dalam saluran urinaria yang

meliputi ginjal, ureter, vesika urinaria, dan urethra. Beberapa faktor predisposisi yang diketahui berpengaruh pada pembentukan kristal adalah ras, jenis kelamin, umur, anatomi dan disfungsi saluran urinaria, metabolisme abnormal, infeksi saluran urinaria, diet, pH urin, dan homeostasis cairan tubuh. Masing-masing faktor predisposisi memiliki peranan penting dalam perkembangan dari berbagai tipe kristal yang terbentuk (Lulich dan Osborne, 2007). Proses pembentukan kristal dari beberapa proses fisiokimia seperti peningkatan eksresi kalsium dan oksalat dalam urin, supersaturasi urin, kristalisasi, agregasi kristal, pertumbuhan kristal, penempelan kristal ke saluran ureter, retensi ureter, dan aglomerasi ureter (Yadav, *et al.*, 2011).

#### 2.4 Tipe Kristal Urolithiasis

Kristal dapat digolongkan berdasarkan kandungan kalsium, densitas, dan komposisi pembentuk kristal. Berdasarkan kandungan kalsium, kristal digolongkan menjadi *calcareous* (kristal yang mengandung kalsium) dan *non calcareous*. Berdasarkan densitasnya (melalui pemeriksaan foto polos abdomen), kristal diklasifikasikan menjadi *radiopaque* dan *radiolucent*. Kristal kalsium atau *calcareous* umumnya bersifat *radiopaque*, sedangkan kristal asam urat, sistin, dan struvit bersifat *radiolucent* (Suharjo dan Cahyono, 2010). Berdasarkan komposisi zat penyusun kristal, dibagi menjadi 4, yaitu:

- a. Kristal kalsium oksalat, kalsium fosfat (70–80%)

Peningkatan eksresi kalsium atau terjadinya hiperkalsiuria mengindikasikan adanya potensi pembentukan kristal yang mengandung senyawa kalsium dan oksalat atau fosfat.

- b. Kristal struvit yang terbentuk dari magnesium, amonium, dan fosfat (5–15%)

Kristal struvit disebut juga sebagai kristal infeksi karena proses terbentuknya kristal terjadi akibat adanya agen infeksi. Kristal infeksi disusun oleh unsur magnesium, amonium, dan fosfat ( $MgNH_4PO_4 \rightarrow 6H_2O$ ).

- c. Kristal sistin (1%)

Kristal sistin terbentuk berdasarkan adanya kelainan resesif autosomal, dimana terjadi gangguan dalam transport asam dikarboksilik sistin, ornithin, lisin, dan arginin. Sistin yang sulit larut memicu proses kristalisasi.

- d. Kristal asam urat (5–10%)

Kristal asam urat terbentuk ketika produksi asam urat yang berlebihan yang dikeluarkan melalui urin (hiperurikosuria). Kelarutan asam urat tergantung dari keasaman atau pH urin.

## 2.5 Patofisiologi Urolithiasis

Menurut Saputra (2009), tahap pembentukan kristal terjadi ketika kation dan anion dari kristal terbentuk karena konsentrasi urin yang jenuh. Pembentukan kristal dapat diidentifikasi sebagai ketidakseimbangnya promotor (kalsium, oksalat, asam urat, fosfat anorganik, dan lain-lain) dan inhibitor (sitrat, magnesium, potassium, pirofosfat, glikoprotein, dan lain-lain). Faktor pH, suhu, dan *flow rate* juga mempengaruhi pembentukan kristal.

Terbentuknya kristal diawali adanya supersaturasi pada urin terhadap unsur kalsium, oksalat, dan asam urat. Supersaturasi urin dapat dibuktikan dengan meningkatnya ekskresi kalsium (hiperkalsiuria), oksalat (hiperoksaluria), dan asam urat (hiperurikosuria) (Suharjo dan Cahyono, 2010). Antara kristal-kristal

kecil yang terbentuk dapat bersatu menjadi agregat dan berkembang menjadi batuan yang besar relatif cepat. Pembentukan kristal dihambat oleh beberapa zat seperti sitrat, magnesium, mukoprotein Tamm-Horsfall yang dihasilkan di tubulus renalis, dan bikunin di urin (Stockham dan Scott, 2008).

### **2.5.1 Hubungan Inflamasi dengan Urolithiasis**

Terbentuk dan terakumulasinya kristal dapat menyebabkan terjadinya obstruksi pada saluran ureter sehingga terjadi inflamasi (Ross, 2005). Inflamasi merupakan reaksi dari tubuh terhadap gangguan membran sel akibat agen infeksius maupun non infeksius. Obstruksi pada saluran ureter akibat akumulasi kristal menyebabkan generasi ROS meningkat. Senyawa ROS adalah senyawa pengoksidasi turunan oksigen yang bersifat sangat reaktif. Fungsi ROS di dalam jaringan adalah menimbulkan reaksi berantai sehingga menyebabkan kerusakan jaringan dan mengganggu fungsi sel. Kedua ROS yang meningkat memicu terjadinya stres oksidatif pada sel dan jaringan di saluran ureter. Stres oksidatif terjadi ketika serangkaian mediator seperti sitokin proinflamasi yang diselesaikan oleh makrofag dapat mengaktifkan leukosit dan memproduksi ROS. Selain itu, berbagai rangsangan inflamasi lainnya seperti NF- $\kappa$ B diidentifikasi sebagai promotor respon inflamasi. NF- $\kappa$ B adalah salah satu regulator penting dalam ekspresi sitokin proinflamasi yang diselesaikan oleh makrofag (Singh, *et al.*, 2006).

Sitokin adalah respon tubuh yang diselesaikan oleh makrofag karena adanya gangguan pada membran sel. Sitokin juga diproduksi oleh sel yang memediasi sistem imun, pada sistem imun spesifik sumber utama sitokin adalah sel T *helper*. Ketika terdapat jaringan mengalami gangguan, makrofag merespon dengan

memproduksi sitokin. Sitokin dari sistem imun non spesifik mempunyai berbagai macam fungsi pertahanan tubuh seperti TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$ . (Abbas dan Lichtman, 2004).

### **2.5.2 Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ )**

Sitokin TNF- $\alpha$  adalah suatu mediator untuk imunitas alami atau natural dan imunitas spesifik atau *acquired*, disamping itu juga merupakan mediator yang penting guna menjembatani antara respon imun spesifik dengan proses inflamasi akut. Sitokin TNF- $\alpha$  berasal dari sekresi makrofag dan sel T (Abbas dan Lichtman, 2004). Peran penting dari TNF- $\alpha$  adalah sebagai regulasi dari sel-sel imun, seperti penyebab demam, apoptosis pada sel, inflamasi, penghambatan tumorigenesis dan replikasi viral, dan respon dari sepsis melalui produksi IL-1 dan IL-6. Sekresi sitokin TNF- $\alpha$  oleh makrofag dihasilkan ketika adanya aktivasi dari jalur NF-kB dan *mitogen activated protein kinase* (MAPK). Aktivasi NF-kB memicu perekutan *IkB kinase* (IKK) yang merupakan enzin kompleks pemicu respon seluler menjadi inflamasi. Kemudian adanya IKK menyebabkan terbentuknya I $kB\alpha$  yang mengikat NF-kB untuk memediasi proliferasi sel, respon inflamasi, dan faktor-faktor apoptosis (Dundar, 2001).

### **2.5.3 Interleukin 1 Beta (IL-1 $\beta$ )**

Sitokin IL-1 $\beta$  merupakan kelompok sitokin urutan pertama yang berperan dalam respon imun untuk memperkuat pengaktifan limfosit Th oleh *antigen presenting cell* (APC). Jumlah IL-1 $\beta$  akan meningkat pada berbagai peristiwa respon imun, termasuk di dalamnya adalah, sekresi antibodi, proliferasi fibroblas, resopsi tulang, dan respon inflamasi seperti urolithiasis. Sitokin ini menjadi salah

satu sitokin penanda terjadinya pembentukan kristal kalsium oksalat. Hal ini dikarenakan kondisi hiperkalsiuria yang memicu terjadinya sekresi sitokin IL-1 $\beta$  yang berlebihan (Mittal, *et al.*, 2008). Bersama dengan TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  merupakan sitokin proinflamasi yang dapat mempengaruhi hampir semua jenis sel sehingga mekanisme sitokin IL-1 $\beta$  mirip dengan TNF- $\alpha$  untuk merespon terjadinya inflamasi (Dundar, 2001).

## 2.6 Bahan Induksi Urolithiasis

### 2.6.1 Etilen Glikol

Etilen glikol adalah senyawa kimia turunan yang dibuat dari beberapa produk kimia komersial seperti *polietilen tereftalat* (PET) resin, poliester resin tak jenuh, serat poliester, dan poliester lapis. Ginjal merupakan organ yang paling peka terhadap etilen glikol dan merupakan target organ primer. Kerusakan ginjal tersebut diakibatkan oleh pembentukan kristal kalsium oksalat pada tubulus ginjal (Cruzan, *et al.*, 2004).

Metabolisme etilen glikol terdiri dari empat tahap, berawal dari perombakan senyawa tersebut di hati dimetabolisme menjadi glikol aldehida oleh alkohol dehidrogenase. Glikolaldehid selanjutnya diubah menjadi glikolat oleh aldehida dehidrogenase pada tahap kedua. Lebih jauh lagi glikolat diubah menjadi glioksilat yang hasil metabolisme selanjutnya adalah oksalat. Senyawa tersebut mengendap bersama kalsium dalam tubuh membentuk kristal kalsium oksalat (Cox dan Phillips, 2004). Keracunan etilen glikol memperlihatkan perbedaan kepekaan antar spesies dan jenis kelamin setelah pemberian jangka panjang, dimana tikus lebih peka daripada mencit dan jenis kelamin jantan lebih peka

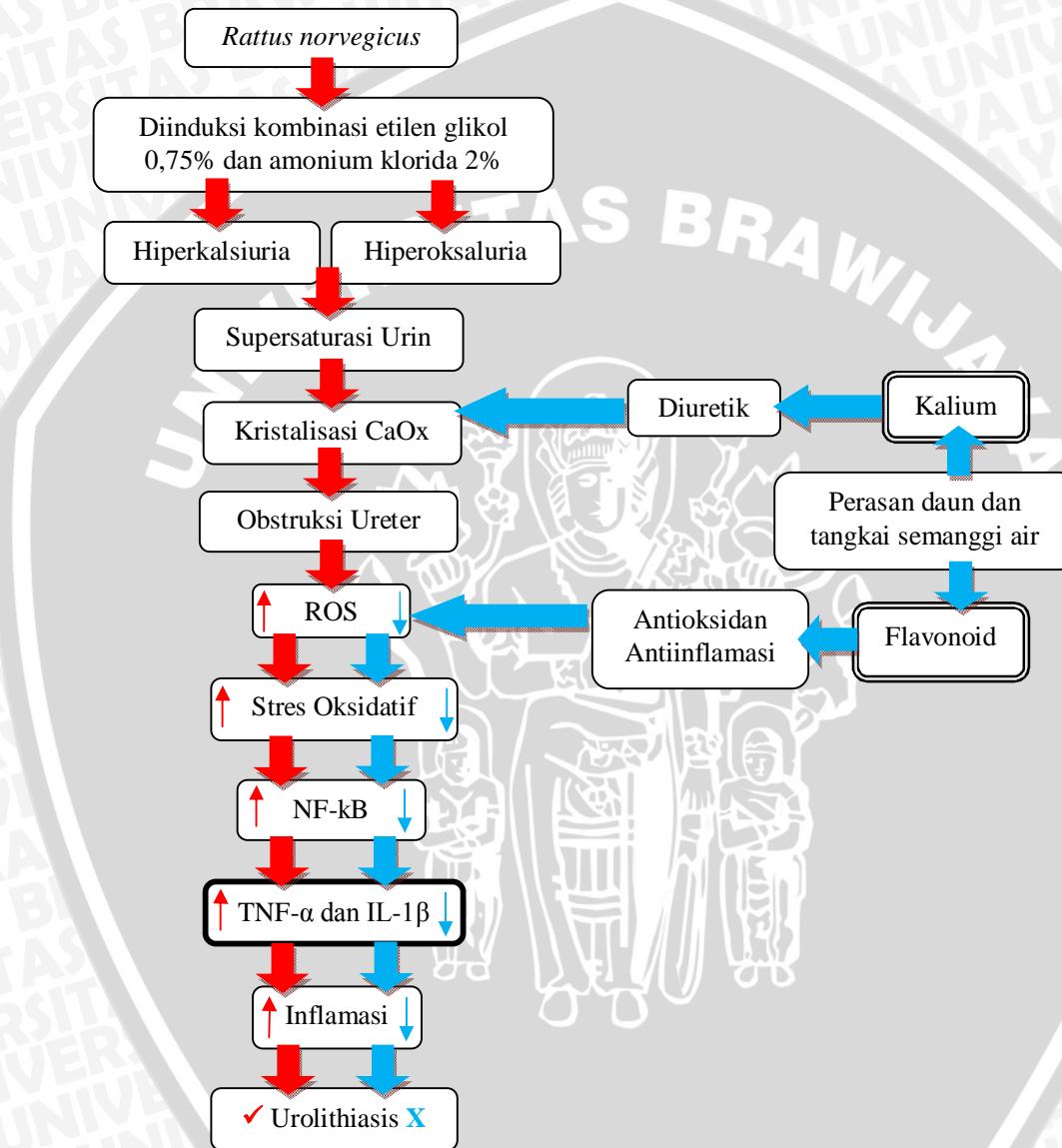
dari pada jenis kelamin betina (Cruzan, *et al.*, 2004). Pemberian etilen glikol (0,75%) selama 24 hari pada hewan coba tikus putih dapat menyebabkan urolithiasis (Jie, *et al.*, 1999).

### 2.6.2 Amonium Klorida

Amonium klorida merupakan garam yang terbuat dari asam kuat HCl dan basa lemah NH<sub>4</sub>OH sehingga amonium klorida merupakan garam yang dapat terhidrolisis dalam air membentuk larutan yang agak asam (pH<7). Amonium klorida digunakan sebagai bahan yang mempercepat terjadinya pembentukan kristal kalsium oksalat. Hal ini karena amonium klorida dapat meningkatkan konsentrasi kalsium dan oksalat pada urin sehingga terjadi peningkatan ekskresi kalsium dan oksalat. Mekanisme tersebut menjadi promotor terjadinya pembentukan kristal kalsium oksalat. Menurut Khan (2011), kombinasi amonium klorida (2%) dan etilen glikol (0,75%) selama 10 hari dapat mempercepat urolithiasis pada hewan coba tikus putih.

## BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL

### 3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Kerangka konseptual

#### Keterangan:

→ Efek induksi kombinasi etilen glikol 0,75% dan amonium klorida 2%

← Efek perasan daun dan tangkai semanggi air

— Zat penghambat urolithiasis

— Variabel yang diteliti

Hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) diinduksi dengan kombinasi etilen glikol 0,75% dan amonium klorida 2%. Bahan-bahan induksi tersebut menyebabkan hiperkalsiuria dan hiperoksaluria sehingga terjadi kejemuhan pada urin atau supersaturasi urin. Supersaturasi urin memicu terjadinya kristalisasi atau nukleasi berupa kristal kalsium oksalat (CaOx) pada saluran ureter. Kalsium menjadi inti dari kristal yang mengalami pertumbuhan kristal sehingga terbentuk kristal dengan beberapa lapisan yaitu, nidus, kristal, *shell*, dan permukaan kristal. Pembentukan kristal kemudian diikuti dengan akumulasi kristal atau aglomerasi kristal, yaitu kristal beragregat bersama dengan membentuk partikel yang lebih besar. Akumulasi kristal pada saluran ureter mengakibatkan gangguan pada proses urinasi sehingga menyebabkan produksi *reactive oxygen species* (ROS) meningkat. Fungsi ROS di dalam sel adalah menimbulkan reaksi berantai sehingga menyebabkan kerusakan jaringan dan mengganggu fungsi sel. Keadaan ROS yang meningkat memicu terjadinya stres oksidatif pada sel-sel di saluran ureter. Hal ini dapat menyebabkan teraktivasinya *nuclear factor kappa B* (NF-kB) sehingga makrofag meresponnya dengan mensekresi sitokin proinflamasi seperti *tumor necrosis factor alpha* (TNF- $\alpha$ ) dan *interleukin 1 beta* (IL-1 $\beta$ ). Setelah proses inflamasi tersebut kemudian gangguan proses urinasi akibat adanya akumulasi kristal yang disebut sebagai penyakit urolithiasis.

Perasan daun dan tangkai semanggi air mengandung senyawa fitokimia yang paling berperan sebagai antiinflamasi dan antioksidan yaitu flavonoid. Flavonoid terdapat pada seluruh bagian tanaman termasuk pada daun, tangkai, dan akar. Flavonoid sebagai antiinflamasi berperan dalam menurunkan generasi ROS.

Penurunan ROS menyebabkan aktivitas stres oksidatif pada jaringan menurun.

Hal ini dapat menyebabkan NF- $\kappa$ B tidak teraktivasi sehingga terjadi penurunan respon dari makrofag untuk mensekresi sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$ . Ketika sitokin TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  mengalami penurunan sehingga proses inflamasi akan berkurang. Selain itu, semanggi air memiliki kandungan mineral seperti kalium yang berfungsi sebagai diuretik untuk memecah kristal. Oleh karena itu, diharapkan pemberian perasan daun dan tangkai semanggi air dapat memecah kristal dan menghambat inflamasi sehingga penyakit urolithiasis tidak terjadi.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Perasan daun dan tangkai semanggi air dapat menghambat urolithiasis pada hewan coba tikus putih dibuktikan dengan penurunan kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$ .

## BAB 4 METODE PENELITIAN

### 4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di beberapa laboratorium yaitu perawatan dan perlakuan terhadap hewan coba dilaksanakan di Klinik Hewan Pendidikan Dokter Hewan PKH UB dan pembedahan dan pengukuran kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  dilaksanakan di Laboratorium Ilmu Faal FK UB. Penelitian ini dilakukan selama bulan April sampai dengan Juni 2013.

### 4.2 Alat dan Bahan Penelitian

#### 4.2.1 Perawatan Hewan Coba

Kandang pemeliharaan kelompok untuk tikus terbuat dari kotak plastik berbentuk persegi panjang dengan ukuran 30 x 50 x 12 cm sebanyak enam buah beralaskan sekam ditutup kawat ram, tempat pakan, tempat minum (*nipple*), sekam, air mineral, dan pakan standar *BR2 Comfeed* (kandungannya adalah jagung, katul, CGM, DDGS, bungkil kedelai, tepung batu, vitamin, mineralm rapassed, tepung daging, tepung tulang, dan CPO).

#### 4.2.2 Pembuatan Perlakuan Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air

Timbangan digital, *juicer*, *beaker glass* 100 ml, tabung reaksi 10 ml, sput 10 ml, *styrofoam*, *icepack*, rak kayu tabung reaksi, sumbat karet tabung reaksi, daun dan tangkai semanggi air, dan aquabidest. Setiap hari memerlukan  $\pm$  100 g daun dan tangkai semanggi air dan 100 ml aquabidest. Sekitar 100 g daun dan tangkai semanggi air menghasilkan  $\pm$  10 ml perasan daun dan tangkai semanggi air dengan konsentrasi 100% (perasan murni), kemudian diencerkan sehingga memiliki konsentrasi bertingkat yaitu 40%, 20%, 10%, dan 5%.

#### **4.2.3 Pembuatan Bahan Induksi Urolithiasis**

Timbangan digital, tabung erlenmeyer 100 ml, spatula, sputit 10 ml, dan tabung reaksi 10 ml. Setiap hari memerlukan 2,16 ml etilen glikol 100%, 5,18 g amonium klorida 100%, dan 40 ml aquadest.

#### **4.2.4 Alat Perlakuan Perasan Kepada Hewan Coba**

Sonde lambung (*oral gavage*).

#### **4.2.5 Pembedahan Tikus**

Gunting bedah, pinset, jarum pentul, kertas label, *eppendorf*, vakutainer, dan alkohol.

#### **4.2.6 Pengukuran Kadar TNF- $\alpha$ dan IL-1 $\beta$ Melalui Metode ELISA**

Tabung sentrifuse, *microplate*, mikropipet, *multichannel* pipet, *shaker* ELISA plate, *yellow tip*, *blue tip*, *white tip*, *eppendorf*, *aluminium foil*, tabung erlenmeyer, tabung reaksi, *beaker glass*, gelas ukur, *washing disk*, *vortex*, inkubator, lemari es, *freezer*, *microplate reader* / ELISA reader, serum darah tikus, aquadest, aquabidest, *coating buffer*, *Tween 20*, *phosphat buffer saline* (PBS), *bovine serum albumin* (BSA), antibodi primer TNF- $\alpha$ , antibodi primer IL-1 $\beta$ , antibodi sekunder TNF- $\alpha$  (TNF- $\alpha$  Ab 1 TNF), antibodi sekunder IL-1 $\beta$  (BB 2 Antirat IgG AP), *streptavidin-horseradish peroxidase* (SA-HRP), *tetra methyl benzidine* (TMB), dan HCl 1 N.

### **4.3 Tahapan Penelitian**

#### **4.3.1 Penetapan Dosis Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air**

Perlakuan perasan daun dan tangkai semanggi air dengan dosis konsentrasi bertingkat, yaitu 5%, 10%, 20%, dan 40%. Berdasarkan dosis konsentrasi tersebut

maka terdapat enam perlakuan, yaitu, kontrol negatif (P1), kontrol positif (P2), perasan semanggi konsentrasi 5% (P3), perasan semanggi konsentrasi 10% (P4), perasan semanggi konsentrasi 20% (P5), dan perasan semanggi konsentrasi 40% (P6). Dosis tersebut dirujuk berdasarkan penelitian (Jagannath, *et al.*, 2012) untuk mengetahui aktivitas antiurolithiasis pada tikus putih menggunakan ekstrak *Asparagus racemosus*. Penggunaan metode perasan dirujuk berdasarkan penelitian (Wijaya dan Darsono, 2005) untuk mengetahui kemampuan antikalkuli menggunakan perasan buah ketimun (*Cucumis sativus L.*).

#### 4.3.2 Penetapan Sampel Penelitian

Kriteria *purposive* hewan coba adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar, jenis kelamin jantan, umur 12 minggu, berat badan antara 175-200 g (Lampiran 7), kondisi sehat (berambut cerah, aktivitas baik, tidak ada abnormalitas anatomis, dan nafsu makan baik), lulus proses sertifikasi layak etik penelitian oleh KEP FKUB (Lampiran 2), dan belum pernah digunakan penelitian.

Hewan coba diadaptasi selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium dan dilakukan pengukuran berat badan untuk kemudian diuji homogenitasnya menggunakan uji Bartlett (Lampiran 4) dan hasil sampel penelitian yang akan digunakan telah dinyatakan homogen. Jumlah hewan coba yang diperlukan untuk masing-masing perlakuan dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut (Kusriningrum, 2008) :

$$\begin{aligned} \text{Sehingga, } & p(n-1) \geq 15 \\ & 6(n-1) \geq 15 \\ & 6n - 6 \geq 15 \\ & 6n \geq 21 \\ & n \geq 4 \end{aligned}$$

**Keterangan :**

p = jumlah perlakuan

n = jumlah minimal ulangan yang diperlukan

Berdasarkan hasil perhitungan di atas, maka untuk perlakuan sejumlah enam kelompok diperlukan minimal empat kali ulangan sehingga hewan coba yang diperlukan adalah 24 ekor.

#### 4.3.3 Penetapan Dosis Bahan Induksi Urolithiasis

Bahan induksi urolithiasis dibuat dengan menggunakan bahan etilen glikol 0,75% dalam bentuk cair dan amonium klorida 2% dalam bentuk serbuk dan diberikan per oral sebanyak 2 ml per ekor per hari. Dosis induksi urolithiasis merujuk pada penelitian Anggraini (2013). Perhitungan dosis tercantum pada Lampiran 5.

#### 4.3.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental dengan desain *post test only control group* menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Hal ini dibuktikan dengan pengujian homogenitas varians data menggunakan uji Bartlett yang tercantum pada Lampiran 4. Hewan coba dibagi menjadi enam kelompok perlakuan yang terdiri dari kontrol positif (P1), kontrol negatif (P2), perlakuan 1 (P3), perlakuan 2 (P4), perlakuan 3 (P5), dan perlakuan 4 (P6).

**Tabel 4.1** Pengamatan hasil penelitian

Kelompok	Keterangan	Variabel yang Diamati
		Sitokin Proinflamasi
		TNF- $\alpha$
P1	Pakan standar dan minum	
P2	Pakan standar + minum + induksi kombinasi etilen glikol 0,75% dan ammonium klorida 2%	
P3	Pakan standar + minum + 5% perasan daun dan tangkai semanggi air + induksi kombinasi etilen glikol 0,75% dan ammonium klorida 2%	
P4	Pakan standar + minum + 10% perasan daun dan tangkai semanggi air + induksi kombinasi etilen glikol 0,75% dan ammonium klorida 2%	
P5	Pakan standar + minum + 20% perasan daun dan tangkai semanggi air + induksi kombinasi etilen glikol 0,75% dan ammonium klorida 2%	
P6	Pakan standar + minum + 40% perasan daun dan tangkai semanggi air + induksi kombinasi etilen glikol 0,75% dan ammonium klorida 2%	

#### 4.3.5 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dari penelitian ini yaitu:

Variabel bebas : - Konsentrasi perasan daun dan tangkai semanggi air,  
- Kombinasi etilen glikol (0,75%) dan ammonium klorida  
(2%)

Variabel tergantung : Kadar sitokin TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$

#### 4.3.6 Analisis Statistika Kadar TNF- $\alpha$ dan IL-1 $\beta$

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Data penelitian berupa nilai kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  serum tikus putih menggunakan ELISA dianalisis statistika dengan uji *one way analysis of variant* (ANOVA).

menggunakan program SPSS 16 *for windows*. Uji lanjutan (*Posthoc Test*) menggunakan uji beda nyata jujur (BNJ) atau *Tukey Test* dengan taraf kepercayaan sebesar 95% dengan ( $\alpha=0,05$ ) (Kusriningrum, 2008).

#### 4.4 Prosedur Kerja

##### 4.4.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba dibagi dalam enam kelompok perlakuan secara acak. Hewan coba diadaptasikan dalam kandang kelompok selama tujuh hari sebelum perlakuan (Koolhaas, 2010). Hewan coba diberi pakan standar sebanyak 20 g (10% dari berat badan) dan minum secara *ad libitum* setiap hari selama tujuh hari selama masa adaptasi. Pemberian pakan dilakukan setiap pagi dan sore.

##### 4.4.2 Pemilihan Daun dan Tangkai Semanggi Air

Daun dan tangkai semanggi air diperoleh dari UPT. Materia Medica Batu.

Daun dan tangkai semanggi air segar, berwarna hijau, dan berumur  $\pm 3$  minggu.

Daun dan tangkai semanggi air ditimbang sebanyak  $\pm 100$  g.

##### 4.4.3 Pembuatan Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air

**Tabel 4.2** Pembuatan perasan daun dan tangkai semanggi air

Alat dan Bahan	Volume dan Konsentrasi Perasan
100 g daun dan tangkai semanggi air diblender	Diperoleh $\pm 10$ ml perasan dengan konsentrasi 100% (perasan murni)
Tabung reaksi 1	Diisi $\pm 10$ ml perasan dengan konsentrasi 100% (perasan murni)
Tabung reaksi 2	Diisi 4 ml perasan dari tabung 1 + 6 ml <i>aquabidest</i> (konsentrasi 40%)
Tabung reaksi 3	Diisi 5 ml perasan dari tabung 2 + 5 ml <i>aquabidest</i> (konsentrasi 20%)
Tabung reaksi 4	Diisi 5 ml perasan dari tabung 3 + 5 ml <i>aquabidest</i> (konsentrasi 10%)
Tabung reaksi 5	Diisi 5 ml perasan dari tabung 4 + 5 ml <i>aquabidest</i> (konsentrasi 5%)

#### 4.4.4 Pemberian Perlakuan

**Tabel 4.3** Pemberian perlakuan

Kelompok	Perlakuan
P1	Pakan standar dan minum
P2	Pakan standar + minum + induksi kombinasi etilen glikol 0,75% dan amonium klorida 2%
P3	Pakan standar + minum + 5% perasan daun dan tangkai semanggi air + induksi kombinasi etilen glikol 0,75% dan amonium klorida 2%
P4	Pakan standar + minum + 10% perasan daun dan tangkai semanggi air + induksi kombinasi etilen glikol 0,75% dan amonium klorida 2%
P5	Pakan standar + minum + 20% perasan daun dan tangkai semanggi air + induksi kombinasi etilen glikol 0,75% dan amonium klorida 2%
P6	Pakan standar + minum + 40% perasan daun dan tangkai semanggi air + induksi kombinasi etilen glikol 0,75% dan amonium klorida 2%

Pemberian perlakuan dilakukan selama 10 hari. Perasan dan bahan induksi urolithiasis diberikan kepada hewan coba secara per oral (PO) menggunakan sonde lambung (*oral gavage*).

#### 4.4.5 Pengambilan Sampel Serum Darah

Hewan coba dieuthanasi melalui dislokasi leher. Pengambilan sampel darah melalui jantung setelah dilakukan pembedahan. Sampel darah dimasukkan ke dalam tabung reaksi tanpa antikoagulan untuk mendapatkan sejumlah serum. Tabung reaksi yang berisi darah tanpa antikoagulan kemudian diendapkan selama 30 menit pada suhu kamar. Tahap berikutnya dilakukan sentrifuse dengan kecepatan 1500 rpm selama 30 menit. Serum darah diambil dengan mikropipet sebanyak 100  $\mu\text{l}$ . Serum darah kemudian dimasukkan ke dalam tabung eppendorf. Serum darah disimpan dalam suhu dingin sebelum dilakukan pengukuran kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  melalui metode ELISA.

#### 4.4.6 Pengukuran Kadar TNF- $\alpha$ dan IL-1 $\beta$

Prosedur pengukuran kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  diawali dengan *coating* antigen serum darah pada *microplate*, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 4°C. Setelah itu, dilakukan pencucian menggunakan PBS + *Tween*-20 (PBS-T). Tahap berikutnya adalah *blocking buffer* dengan *bovine serum albumin* (BSA) selama 30 menit pada suhu ruang. Setelah itu, dilakukan pencucian menggunakan PBS + *Tween*-20 (PBS-T). Tahap selanjutnya adalah penambahan antibodi primer, kemudian didiamkan selama 1 jam pada suhu ruang. Setelah itu, dilakukan pencucian menggunakan PBS + *Tween*-20 (PBS-T). Tahap berikutnya adalah penambahan antibodi sekunder, kemudian didiamkan selama 1 jam pada suhu ruang. Setelah itu, dilakukan pencucian menggunakan PBS + *Tween*-20 (PBS-T). Tahap selanjutnya adalah penambahan *streptavidin-horseradish peroxidase* (SA-HRP) sebagai enzim, kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang. Setelah itu, dilakukan pencucian menggunakan PBS + *Tween*-20 (PBS-T). Tahap berikutnya adalah penambahan substrat *tetra methyl benzidine* (TMB), kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang. Setelah itu, dilakukan penambahan *stop solution* untuk menghentikan reaksi dengan HCl yang dilanjutkan dengan inkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Tahap akhir adalah dilakukan pengukuran absorbansinya menggunakan ELISA *reader* dengan panjang gelombang ( $\lambda=450$  nm) (Lampiran 8 dan 9).

## BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

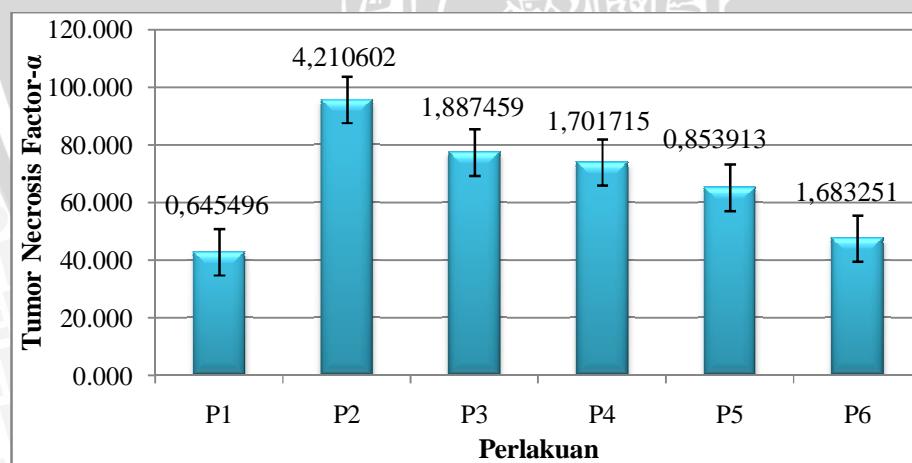
### 5.1 Pengaruh Perlakuan Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air Terhadap Kadar TNF- $\alpha$

Hasil pengukuran kadar TNF- $\alpha$  melalui metode ELISA dan dilakukan analisis statistika menggunakan *one way* ANOVA didapatkan hasil pengukuran yang signifikan ( $p<0,05$ ) antar kelompok perlakuan (Tabel 5.1 dan Gambar 5.1).

**Tabel 5.1** Hasil analisis kadar TNF- $\alpha$

Kelompok Perlakuan	Ulangan	Rata-rata ± Standar Deviasi $p (<0,05)$ (kadar TNF- $\alpha$ dalam $\mu\text{g/ml}$ )
P1 (kontrol negatif)	4	$42,750 \pm 0,645496^{\text{a}}$
P6 (perasan semanggi 40%)	4	$47,500 \pm 1,683251^{\text{a}}$
P5 (perasan semanggi 20%)	4	$65,125 \pm 0,853913^{\text{b}}$
P4 (perasan semanggi 10%)	4	$73,875 \pm 1,701715^{\text{c}}$
P3 (perasan semanggi 5%)	4	$77,375 \pm 1,887459^{\text{c}}$
P2 (kontrol positif)	4	$95,625 \pm 4,210602^{\text{d}}$

**Keterangan :** Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan  
 $p$  = nilai signifikansi



**Gambar 5.1** Grafik batang kadar TNF- $\alpha$  ( $\mu\text{g/ml}$ )

**Keterangan :** P1 = kontrol negatif, P2 = kontrol positif, P3 = perasan semanggi 5%, P4 = perasan semanggi 10%, P5 = perasan semanggi 20%, P6 = perasan semanggi 40%

Berdasarkan Tabel 5.1 menunjukkan kelompok P2 jika dibandingkan dengan kelompok P1 maka terlihat nilai kadar TNF- $\alpha$  mengalami kenaikan sangat signifikan. Hal ini sesuai dengan penelitian Jagannath, *et al.* (2012) yang menyatakan bahwa induksi kombinasi etilen glikol 0,75% dan amonium klorida 2% pada tikus putih selama 10 hari dapat menyebabkan terjadinya urolithiasis. Hal ini dikarenakan metabolisme akhir etilen glikol adalah senyawa oksalat yang kemudian mengendap bersama kalsium membentuk kristal kalsium oksalat (CaOx). Selain itu, penambahan amonium klorida dapat meningkatkan kadar kalsium dan oksalat dalam urin sehingga terjadi peningkatan ekskresi kalsium (hiperkalsiuria) dan oksalat (hiperoksaluria). Kondisi tersebut menyebabkan urin mengalami kejemuhan (supersaturasi) dan mengakibatkan terjadinya percepatan pembentukan CaOx (kristalisasi) pada saluran ureter (Khan, 2011). Kristal CaOx yang secara terus menerus mengendap dan terakumulasi di saluran ureter yang akan menyebabkan obstruksi sehingga proses urinasi akan terganggu dan menimbulkan luka di saluran ureter.

Adanya luka di saluran ureter memicu produksi *reactive oxygen species* (ROS) berlebihan sehingga jaringan di saluran ureter mengalami kondisi stres oksidatif. Stres oksidatif adalah keadaan di mana jumlah radikal bebas di dalam tubuh melebihi kapasitas tubuh untuk menetralkannya. Akibatnya intensitas proses oksidasi sel-sel tubuh normal menjadi semakin tinggi dan menimbulkan kerusakan yang lebih banyak. Keadaan ini direspon oleh sistem imun dengan mengaktifkan *nuclear factor kappa B* (NF- $\kappa$ B) melalui jalur transduksi sinyal *toll like receptor* (TLR). Transduksi sinyal ini menghasilkan induksi berbagai ciri

imunitas nonspesifik seperti produksi sitokin proinflamasi. Interaksi sinyal dengan reseptor diawali dengan adanya stimulus yang berikatan dengan bagian ekstraseluler TLR. Ikatan tersebut memicu penggabungan TLR dengan *myeloid differentiation primary respons protein 88* (MY88) sehingga teraktivasinya *transforming growth factor b activated kinase* (TAK1). Aktivasi TAK1 memicu perekutan *IkB kinase* (IKK) kompleks yang terdiri dari IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , dan IKK $\gamma$  melepaskan salah satu komponennya yaitu IKK $\alpha$ . IKK kompleks merupakan enzim kompleks pemicu respon seluler menjadi inflamasi (Dundar, 2001). Lepasnya IKK $\alpha$  dari struktur IKK kompleks diakibatkan oleh fosforilasi IKK $\beta$  menjadi I $k$ B yang berikatan dengan NF-kB untuk memediasi proliferasi sel, respon inflamasi, dan faktor-faktor apoptosis (Guiglano, *et al.*, 2006). Akibat adanya stimulus, I $k$ B mengalami degradasi proteosomal dan NF-kB mengalami transkripsi di nukleus. Di dalam nukleus, faktor NF-kB berikatan dengan target gen dan menstimulasi terjadinya transkripsi gen inflamasi. Aktivasi NF-kB yang mengalami peningkatan direspon oleh makrofag untuk memproduksi dan mensekresi sitokin proinflamasi TNF- $\alpha$  sebagai indikator terjadinya inflamasi.

Sitokin proinflamasi TNF- $\alpha$  adalah protein yang memediasi komunikasi sel-sel secara autokrin, parakrin, dan endokrin. Sitokin TNF- $\alpha$  dihasilkan oleh makrofag di ginjal berupa sel-sel mesangial. Cara kerja sitokin TNF- $\alpha$  adalah dengan mengatur aktivasi, diferensiasi, dan proliferasi sel dalam proses inflamasi, Sitokin TNF- $\alpha$  juga memiliki aktivitas kuat dalam mempromosikan apoptosis dan mengeliminasi sel-sel yang rusak. Kadar sitokin TNF- $\alpha$  rendah menyebabkan sitokin TNF- $\alpha$  menginduksi inflamasi akut. Kadar sitokin TNF- $\alpha$  sedang berperan

dalam inflamasi sistemik. Kadar sitokin TNF- $\alpha$  tinggi menimbulkan kelainan patologi *shock sepsis*. Selain itu, sitokin TNF- $\alpha$  juga menstimulus inflamasi dengan merangsang fagosit mononuklear untuk mensekresi sitokin IL-1 $\beta$ , (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009).

Berdasarkan analisis statistika diketahui bahwa perlakuan perasan daun dan tangkai semanggi air memberikan pengaruh secara signifikan terhadap penurunan kadar TNF- $\alpha$  pada kelompok P3, P4, P5, dan P6. Dari Tabel 5.1 dapat diketahui kelompok P6 menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata dengan kelompok P1 (kontrol negatif). Hal ini dikarenakan perasan daun dan tangkai semanggi air memiliki kandungan flavonoid. Semakin tinggi konsentrasi semanggi air yang diberikan, maka akan memiliki kandungan flavonoid yang tinggi juga sehingga kelompok P6 yang diberikan perasan semanggi air dengan konsentrasi 40% memiliki nilai kadar TNF- $\alpha$  mendekati kontrol negatif, yaitu  $47,500 \pm 1,683251$ .

Kandungan flavonoid yang berasal dari perasan daun dan tangkai semanggi air berfungsi sebagai antioksidan dan antiinflamasi untuk menghambat urolithiasis. Mekanisme hambatan yang dilakukan oleh flavonoid sebagai antioksidan bisa terjadi secara langsung maupun tidak langsung. Flavonoid sebagai antioksidan secara langsung adalah dengan mendonorkan ion hidrogen sehingga ion-ion yang mengalami radikal bebas berubah menjadi stabil. Keadaan ion yang telah stabil menyebabkan menurunnya keadaan stres oksidatif di dalam jaringan. Flavonoid sebagai antioksidan secara tidak langsung yaitu dengan meningkatkan ekspresi gen antioksidan endogen melalui beberapa mekanisme.

Salah satu mekanisme peningkatan ekspresi gen antioksidan adalah melalui aktivasi *nuclear related factor 2* (Nrf2) sehingga terjadi peningkatan gen yang berperan dalam sintesis enzim antioksidan endogen seperti misalnya gen *superoxide dismutase* (SOD) (Sumardika dan Jawi, 2012).

Flavonoid juga berperan sebagai antiinflamasi terhadap kondisi sel yang mengalami stres oksidatif. Mekanisme antiinflamasi dari flavonoid adalah dengan menurunkan stimulus inflamasi sehingga IKK kompleks yang terdiri dari IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , dan IKK $\gamma$  tidak melepaskan salah satu komponennya yaitu IKK $\alpha$ . Tidak lepasnya IKK $\alpha$  dari struktur IKK kompleks mengakibatkan menurunnya fosforilasi IKK $\alpha$  menjadi I kB. Adanya penurunan fosforilasi IKK $\alpha$  menyebabkan I kB tidak mengalami degradasi proteosomal dan menurunnya aktivasi NF-kB untuk melakukan transkripsi di nukelus. Selain itu, menurunnya aktivasi NF-kB juga dipengaruhi oleh efek inhibisi monosit terhadap enzim *protein tyrosin kinase* (PTK) p56 yang mengakibatkan PTK tidak aktif (Yilmaz, *et al.*, 2011). Tidak teraktivasinya PTK menyebabkan faktor transkripsi NF-kB tetap berikatan dengan inhibitor NF-kB sehingga NF-kB tidak dapat menduduki respon elemen yang seharusnya dapat memicu transkripsi dan translasi dari sitokin proinflamasi TNF- $\alpha$  yang disekresi oleh makrofag (Abbas and Lichtman, 2004).

Hasil perhitungan statistik diatas menunjukkan bahwa pemberian perasan daun dan tangkai semanggi air dengan dosis 5%, 10%, 20%, dan 40% pada tikus putih yang diberi induksi bahan urolithiasis dapat menurunkan kadar TNF- $\alpha$ . Kelompok P6 yang diberi perasan daun dan tangkai semanggi air dengan dosis 40% menunjukkan bahwa dosis yang dipakai adalah dosis paling baik dalam

menghambat terjadinya urolithiasis. Hasil kadar TNF- $\alpha$  pada kelompok P6 menunjukkan hasil yang paling baik dengan adanya penurunan yang jelas, bahkan dapat menunjukkan kadar TNF- $\alpha$  yang mendekati kelompok P1 (kontrol negatif).

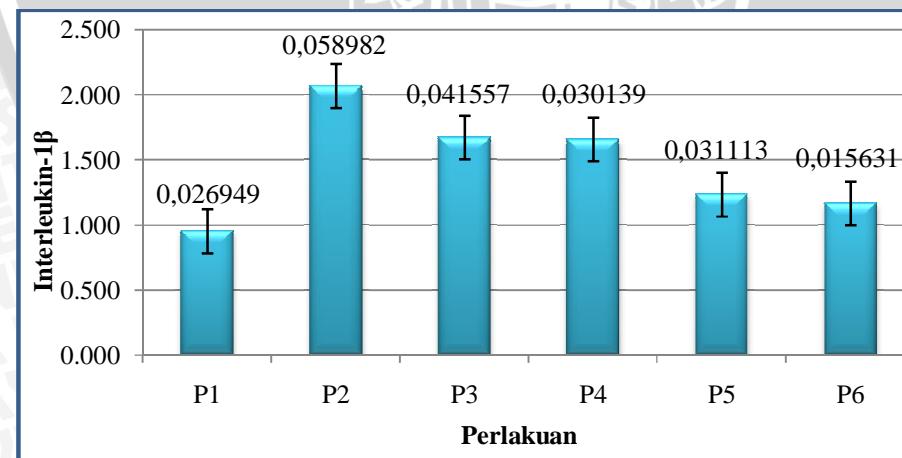
## 5.2 Pengaruh Perlakuan Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air Terhadap Kadar IL-1 $\beta$

Hasil pengukuran kadar IL-1 $\beta$  melalui metode ELISA dan dilakukan analisis statistika menggunakan *one way* ANOVA didapatkan hasil pengukuran yang signifikan ( $p<0,05$ ) antar kelompok perlakuan (Tabel 5.2 dan Gambar 5.2).

**Tabel 5.2** Hasil analisis kadar IL-1 $\beta$

Kelompok Perlakuan	Ulangan	Rata-rata ± Standar Deviasi $p (<0,05)$ (kadar IL-1 $\beta$ dalam $\mu\text{g/ml}$ )
P1 (kontrol negatif)	4	$0,9533 \pm 0,026949^{\text{a}}$
P6 (perasan semanggi 40%)	4	$1,1655 \pm 0,015631^{\text{b}}$
P5 (perasan semanggi 20%)	4	$1,2340 \pm 0,031113^{\text{b}}$
P4 (perasan semanggi 10%)	4	$1,6575 \pm 0,030139^{\text{c}}$
P3 (perasan semanggi 5%)	4	$1,6715 \pm 0,041557^{\text{c}}$
P2 (kontrol positif)	4	$2,0678 \pm 0,058982^{\text{d}}$

**Keterangan :** Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan  
 $p$  = nilai signifikansi



**Gambar 5.2** Grafik batang kadar IL-1 $\beta$  ( $\mu\text{g/ml}$ )

**Keterangan :** P1 = kontrol negatif, P2 = kontrol positif, P3 = perasan semanggi 5%, P4 = perasan semanggi 10%, P5 = perasan semanggi 20%, P6 = perasan semanggi 40%

Berdasarkan Tabel 5.2 menunjukkan kelompok P2 jika dibandingkan dengan kelompok P1 maka terlihat nilai kadar IL-1 $\beta$  mengalami kenaikan sangat signifikan. Hal ini sesuai dengan penelitian Susilawati, dkk. (2003) yang menyatakan bahwa kombinasi bahan induksi etilen glikol 0,75% dan amonium klorida 2% pada tikus putih selama 10 hari dapat menyebabkan terjadinya urolithiasis. Hal ini disebabkan bahan induksi etilen glikol menghasilkan senyawa oksalat yang mengendap bersama kalsium membentuk kristal kalsium oksalat (CaOx). Selain itu, penambahan bahan induksi amonium klorida dapat menyebabkan kadar kalsium dan oksalat pada urin meningkat (hiperkalsiuria dan hiperoksaluria). Kondisi urin tersebut menyebabkan terjadinya kejemuhan (supersaturasi) dan mempercepat pembentukan CaOx (kristalisasi) pada saluran ureter (Khan, 2011). Pembentukan kristal akan mengalami pertumbuhan sehingga terbentuk kristal dengan beberapa lapisan yaitu, nidus, kristal, *shell*, dan permukaan kristal. Pembentukan kristal kemudian diikuti dengan akumulasi kristal atau aglomerasi kristal, yaitu kristal beragregat bersama dengan membentuk partikel yang lebih besar. Akumulasi kristal pada saluran ureter mengakibatkan gangguan proses urinasi dan menimbulkan luka di jaringan saluran ureter.

Luka di saluran ureter memicu produksi radikal bebas seperti ROS yang berlebihan sehingga jaringan di saluran ureter mengalami kondisi stres oksidatif. Jaringan yang mengalami stres oksidatif akan mengakibatkan proses oksidasi sel-

sel tubuh normal menjadi semakin meningkat dan menyebabkan kerusakan yang lebih banyak. Kondisi tersebut direspon oleh sistem imun dengan mengaktivasi NF- $\kappa$ B melalui jalur transduksi sinyal TLR. Aktivasi jalur sinyal TLR menunjukkan berbagai efek, yaitu memicu ekspresi gen yang berperan dalam inflamasi, menginduksi perubahan dalam *antigen presenting cell* (APC) lebih efisien dalam presentasi antigen, dan menimbulkan sintesis dan ekspor sinyal molekul interseluler yang mempengaruhi perilaku leukosit dan sel lainnya.

Jalur sinyal transduksi TLR diawali dengan adanya stimulus yang berikatan dengan bagian ekstraseluler. Ikatan tersebut mengakibatkan penggabungan TLR dengan MY88 membentuk kompleks *IL-1 receptor associated kinase 1* (IRAK 1) dan *IL-1 receptor associated kinase 4* (IRAK 4). Setelah itu, IRAK4 memfosforilasi IRAK1 sehingga mengaktivasi TAK1. Teraktivasinya TAK1 memicu perekutan IKK kompleks yang terdiri dari IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , dan IKK $\gamma$  melepaskan salah satu komponennya yaitu IKK $\alpha$ . IKK kompleks merupakan enzim kompleks pemicu respon seluler menjadi inflamasi (Dundar, 2001). Komponen IKK $\alpha$  yang terlepas dari struktur IKK kompleks diakibatkan oleh fosforilasi IKK $\alpha$  menjadi I $\kappa$ B yang berikatan dengan NF- $\kappa$ B untuk memediasi proliferasi sel, respon inflamasi, dan faktor-faktor apoptosis (Guiglano, *et al.*, 2006). Kemudian I $\kappa$ B mengalami degradasi proteosomal dan NF- $\kappa$ B masuk ke dalam nukleus untuk melakukan transkripsi dan translasi gen inflamasi. Peningkatan aktivasi NF- $\kappa$ B kemudian direspon oleh makrofag untuk memproduksi dan mensekresi sitokin-sitokin proinflamasi. Salah satu sitokin proinflamasi yang digunakan sebagai indikator terjadinya inflamasi adalah IL-1 $\beta$ .

Sitokin proinflamasi IL-1 $\beta$  juga dikenal sebagai katabolin yang merupakan protein sitokin yang dikode oleh gen IL-1 $\beta$ . Sitokin IL-1 $\beta$  dihasilkan oleh makrofag di ginjal berupa sel-sel mesangial. Sitokin IL-1 $\beta$  merupakan mediator penting dari respon inflamasi dan terlibat dalam berbagai kegiatan selular, termasuk proliferasi sel, diferensiasi, dan apoptosis. Fungsi sitokin IL-1 $\beta$  selain sebagai indikator inflamasi adalah bersama dengan TNF- $\alpha$  mengerahkan neutrofil dan monosit ke tempat inflamasi untuk menyingkirkan antigen atau stimulus terjadinya inflamasi, merangsang fagosit mononuklear untuk mensekresi IL-1 $\beta$ , dan merangsang hipotalamus menginduksi panas (pirogen endogen). Induksi cyclooxygenase-2 (COX2) oleh sitokin IL-1 $\beta$  dalam sistem saraf pusat (SSP) ditemukan untuk berkontribusi hipersensitivitas nyeri inflamasi (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009).

Berdasarkan analisis statistika diketahui bahwa perlakuan perasan daun dan tangkai semanggi air memberikan pengaruh secara signifikan terhadap penurunan kadar IL-1 $\beta$  pada kelompok P3, P4, P5, dan P6. Dari Tabel 5.2 dapat diketahui kadar IL-1 $\beta$  pada kelompok P6 mendekati kelompok P1 (kontrol negatif) walaupun tidak menunjukkan perbedaan yang nyata. Hal ini dikarenakan perasan daun dan tangkai semanggi air memiliki kandungan flavonoid. Semakin tinggi konsentrasi semanggi air yang diberikan, maka akan memiliki kandungan flavonoid yang tinggi juga sehingga kelompok P6 yang diberikan perasan semanggi air dengan konsentrasi 40% memiliki nilai kadar IL-1 $\beta$  mendekati kontrol negatif, yaitu  $1,1655 \pm 0,015631$ .

Kandungan fitokimia flavonoid berasal dari perasan daun dan tangkai semanggi air yang berfungsi sebagai antioksidan dan antiinflamasi. Flavonoid bersifat sebagai antioksidan dengan cara menangkap radikal bebas, sehingga sangat penting dalam mempertahankan keseimbangan antara oksidan dengan antioksidan di dalam tubuh. Selain itu, flavonoid berfungsi untuk menetralisir efek toksik dari radikal bebas seperti ROS. Mekanisme flavonoid untuk menetralisir ROS adalah dengan cara mendonorkan ion hidrogen sehingga ion-ion yang mengalami radikal bebas berubah menjadi stabil. Keadaan ion yang telah stabil menyebabkan menurunnya keadaan stres oksidatif di dalam jaringan. Flavonoid sebagai antioksidan juga dapat meningkatkan ekspresi gen antioksidan endogen melalui beberapa mekanisme. Salah satu mekanisme peningkatan ekspresi gen antioksidan adalah melalui aktivasi Nrf2 sehingga terjadi peningkatan gen yang berperan dalam sintesis enzim antioksidan endogen seperti misalnya enzim SOD (Sumardika dan Jawi, 2012).

Flavonoid juga berperan sebagai antiinflamasi terhadap kondisi sel yang mengalami stres oksidatif. Mekanisme antiinflamasi dari flavonoid adalah dengan menurunkan stimulus inflamasi sehingga IKK kompleks yang terdiri dari IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , dan IKK $\gamma$  tidak melepaskan salah satu komponennya yaitu IKK $\alpha$ . Tidak lepasnya IKK $\alpha$  dari struktur IKK kompleks mengakibatkan menurunnya fosforilasi IKK $\alpha$  menjadi I kB. Adanya penurunan fosforilasi IKK $\alpha$  menyebabkan I kB tidak mengalami degradasi proteosomal dan menurunnya aktivasi NF-kB untuk melakukan transkripsi di nukelus. Selain itu, menurunnya aktivasi NF-kB juga dipengaruhi oleh efek inhibisi monosit terhadap enzim PTK p56 yang

mengakibatkan PTK tidak aktif (Yilmaz, *et al.*, 2011). Tidak teraktivasinya PTK menyebabkan faktor transkripsi NF- $\kappa$ B tetap berikatan dengan inhibitor NF- $\kappa$ B sehingga NF- $\kappa$ B tidak dapat menduduki respon elemen yang seharusnya dapat memicu transkripsi dan translasi dari sitokin proinflamasi IL-1 $\beta$  yang disekresi oleh makrofag (Abbas and Lichtman, 2004).

Hasil perhitungan statistik diatas menunjukkan bahwa pemberian perasan daun dan tangkai semanggi air dengan dosis 5%, 10%, 20%, dan 40% pada tikus putih yang diberi induksi bahan urolithiasis dapat menurunkan kadar IL-1 $\beta$ . Kelompok P6 yang diberi perasan daun dan tangkai semanggi air dengan dosis 40% menunjukkan bahwa dosis yang dipakai adalah dosis paling baik dalam menghambat terjadinya urolithiasis walaupun kadarnya masih berbeda signifikan dengan kelompok P1 (kontrol negatif).

## BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa perasan daun dan tangkai semanggi air (*Marsilea crenata*) pada konsentrasi 40% dapat menghambat urolithiasis pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) dibuktikan dengan penurunan kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$ .

### 6.2 Saran

1. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui manfaat perasan daun dan tangkai semanggi air sebagai antioksidan dan antiinflamasi untuk terapi urolithiasis.
2. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pengaruh daun dan tangkai semanggi air terhadap metabolisme hati.
3. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk memperoleh umur simpan (*shelf-life*) perasan daun dan tangkai semanggi air.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., dan Lichtman, A.H. 2004. *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*, 2nd Edition. Saunders. Philadelphia. 27, 34-37, 44, 108, 114-116.
- Anggraini, S. 2013. Uji Aktivitas Penghambatan Batu Ginjal (Anti Nefrolithiasis) Ekstrak Etanol Dari Herbal Pegagan *Centella asiatica L.* Urban Pada Tikus Jantan. *Scientific Journals of Bogor Agricultural University* 2 (1) : 1-5.
- Arifin, M. 2009. Analisis Mikroskopi dan Kandungan Mineral Semanggi Air *Marsilea crenata Presl.* (Marsileaceae). *Scientific Journals of Bogor Agricultural University* 6 (4) : 1-10.
- Baggio, B., Budakovic, A., Nassuato, M.A., Vezzoli, G., Manzato, E., Luisetto, G., dan Zaninotto, M. 2000. Plasma Phospholipid Arachidonic Acid Content And Calcium Metabolism In Idiopathic Calcium Nephrolithiasis. *Kidney International* 58 : 1278-1284.
- Baratawidjaja, K.G dan Rengganis, I. 2009. *Imunologi Dasar*. Balai Penerbit FKUI. Jakarta.
- Brown, G.C. 2007. Mechanism of Inflammatory Neurodegeneration: iNOS and NADPH Oxidase. *Biochemical Society Transactions* 35 (5) : 1119-1121.
- Brunetti, C., Ferdinando, M.D., Fini, A., Pollastri, S., dan Tattini, M. 2013. Flavonoids as Antioxidants and Developmental Regulators: Relative Significance in Plants and Humans. *International Journal of Molecular Science* : 3540-3555.
- Champion, P.D. dan Clayton, J.S. 2001. *Border Control for Potential Aquatic Weeds*. Departemen Conversation Press. New Zealand.
- Cox, R.D. dan Phillips, W.J. 2004. Ethylene Glycol Toxicity. *Military Medicine* 169 (8) : 660-663.
- Cruzan, G., Corley, R.A., Hard, G.C., Mertens, J.J., McMartin, K.E., Snellings, W.M., Gingell, R., dan Deyo, J.A. 2004. Subchronic Toxicity of Ethylene Glycol in Wistar and F-344 Rats Related to Metabolism and Clearance of Metabolites. *Toxicological Sciences* 81 (2) : 502-511.
- Dundar, M., Kocak, I., Yenisey, C., Serter, M., dan Ozeren, B. 2001. Urinary and Serum Cytokine Levels in Patients Undergoing SWL. *Brazilian Journal of Urology* : 495-499.

- Fuadi, A. 2009. Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Alpukat (*Persea Americana Mill*) Terhadap Gambaran Ureum dan Kreatinin Pada Tikus Jantan Yang Diinduksi Etilen Glikol. *Scientific Journals of Bogor Agricultural University* 8 (5) : 1-10.
- Ghodasara, J., Pawar, A., Deshmukh, C., dan Kuchekar, B. 2010. Inhibitory Effect of Rutin and Curcumin on Experimentally Induced Calcium Oxalate Urolithiasis in Rats. *Pharmacology Journal* 2 (6) : 388-392.
- Gisselman, K., Langston, C., Palma, D., dan McCue, J. 2009. Calcium Oxalate Urolithiasis. *Compendium: Continuing Education for Veterinarians* : 496-502.
- Giugliano, D., Ceriello, A., dan Esposito, K. 2006. The Effect of Diet on Inflammation. *Journal of the American College of Cardiology* 48 (4) : 677-685.
- Hesse, A. 2008. Canine Urolithiasis: Epidemiology and Analysis of Urinary Calculi. *Journal of Small Animal Practice* 31 (12) : 599-604.
- Jagannath, N., Somashekara, S., Chikkannasetty, dan Govindadas, D., Devasankaraiah, D. 2012. Study of Antiurolithiatic Activity of *Asparagus racemosus* on Albino Rats. *Indian Journal of Pharmacology* 44 (5) : 576-579.
- Jie, F., Glass, M.A., dan Chandhoke, P.S. 1999. Impact of Ammonium Chloride Administration On A Rat Ethylene Glycol Urolithiasis Model. *Scanning Microscopy* 13 (2) : 299-306.
- Johnson, D.M. 2011. Systematics of the New World Species of Marsilea (Marsileaceae). *American Society of Plant Taxonomists* : 1-11.
- Khan, A., Bashir, S., Khan, S.R., dan Gilani, A.H. 2011. Antiurolithic Activity of *Origanum vulgareis* Mediated Through Multiple Pathways. *BMC Complementary and Alternative Medicine* : 1-16.
- Khan, N.I., Shinghe, J.S., dan Naikwade, N.S. 2010. Antilithiatic Effect of *Hellianthus annuus Linn*, Leaf Extract in Ethylene Glycol and Ammonium Chloride Induced Nephrolithiasis. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2 (4) : 180-184.
- Koolhaas, J.M. 2010. *The UFAW Handbook on The Care and Management of Laboratory and Other Research Animals, The Laboratory Rat*, 8th Edition. Wiley Blackwell. Groningen.

- Kristiono, S.S. 2009. Analisis Mikroskopis dan Fitokimia Semanggi Air *Marsilea crenata Presl* (Marsileaceae). *Scientific Journals of Bogor Agricultural University* 5 (1) : 1-9.
- Kusriningrum. 2008. *Perancangan Percobaan*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Laikangbam, R., dan Devi, M.D. 2011. Inhibition of Calcium Oxalate Crystal Deposition on Kidneys of Urolithiatic by *Hibiscus sabdariffa L* Extract. *International Urology Journal* (40) : 211-218.
- Langston, C., Gisselman, K., Palma, D., dan McCue, J. 2008. Diagnosis of Urolithiasis. *Compendium: Animal Medical Center* : 447-455.
- Lulich, J.P. dan Osborne, C.A. 2007. *Management of Urolithiasis*. BSAVA Manual of Canine and Feline Nephrology and Urology, 2nd Edition. London : 252-263.
- Markwell, P.J. dan Stevenson, A.E. 2000. Nutritional Management of Canine Urolithiasis. *Waltham Focus* 10 (1) : 10-13.
- Mittal, R.D., Bid, H.K., Manchanda, K.P., dan Kapoor, R. 2008. Predisposition of Genetic Polymorphism With The Risk of Urolithiasis. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 23 (2) : 106-116.
- Nisma, F. 2010. Pengaruh Penambahan Ekstrak Etanol 70% Buah Anggur Biru (*Vitis vinifera L.*) Terhadap Kelarutan Kalsium Batu Ginjal. *UHAMKA Press* : 1-17.
- Nurjanah, A.A. dan Abdullah, A. 2012. Aktivitas Antioksidan dan Komponen Bioaktif Semanggi Air (*Marsilea crenata*). *Jurnal Inovasi dan Kewirausahaan*, Volume 1 : 152-158.
- Rastini, E.K., Widodo, M.A., dan Rohman, M.S. 2010. Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia L.*) Terhadap Aktivasi NF- $\kappa$ B dan ekspresi protein (TNF- $\alpha$ , ICAM-1) pada Kultur Sel Endotel (HUEVCs) Dipapar Ox-LDL. *Journal Experiment Science* 1 (1) : 1-55.
- Ross, L.A. 2005. Calcium Oxalate Urolithiasis in Dogs and Cats. *Standards of Care: Emergency and Critical Care Medicine from The Publisher of Compendium* 77 : 1-6.
- Saputra, A.A.H. 2009. Uji Aktivitas Anti Lithiasis Ekstrak Etanol Daun Alpukat (*Persea americana Mill*) Pada Tikus Jantan. *Scientific Journals of Bogor Agricultural University* 14 (2) : 1-13.

- Shah, B.N., Raiyani, K.D., dan Modi, D.C. 2011. Antiurolithiatic Activity Studies of *Memordica charantia Linn* Fruits. *International Journal of Pharmacy Research and Technology* 1 (1) : 6-11.
- Singh, D., Kaur, R., Chander, V., dan Chopra, K. 2006. Antioxidants in The Prevention of Renal Disease. *Journal Medicine Food* 9 (4) : 443–450.
- Sirait. 2007. *Penuntun Fitokimia dalam Farmasi*. Institut Teknologi Bandung Press. Bandung.
- Sirois, M. 2005. *Laboratory Animal Medicine: Principles and Procedures*. Elsevier Press. Washington.
- Sparkes, A.H. dan Philippe, C.J. 2008. Urolithiasis in Cats: Managing The Risks. *Nestle Purina Pet Care* : 1-7.
- Steenis, C. 2008. *Flora*. Pradnya Paramita. Jakarta.
- Stockham, S.L. dan Scott, M.A. 2008. *Fundamental of Veterinary Clinical Pathology*, 2nd Edition. Blackwell Publishing. Iowa.
- Suharjo, J.B. dan Cahyono, B. 2010. Manajemen Batu Ginjal. *Focus Medicinus* 23 (1) : 29-34.
- Sumardika, I.W. dan Jawi, I.M. 2012. Ekstrak Air Daun Ubi Jalar Ungu Memperbaiki Profil Lipid Dan Meningkatkan Kadar SOD Darah Tikus Yang Diberi Makanan Tinggi Kolesterol. *Medicina* 43 : 67-71.
- Susilawati, H.L., Shanty, L., dan Sutarno. 2003. Analisis Kimia Fisika Urin Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Setelah Pemberian Ekstrak Daun Seledri (*Apium graveolens Linn.*). *Jurnal Biosmart*, Volume 5 : 43-46.
- Tak, P.P dan Firestein, G.S. 2001. NF- $\kappa$ B : A Key Role In Inflammatory Diseases. *The Journal of Clinical Investigation*, 107 (1) : 7-10.
- Vyas, N. dan Argal, A. 2012. Antiurolithiatic Activity of Extract and Oleanolic Acid Isolated From The Roots of *Lantana camara*. *Phytopharmacology* 3 (1) : 326-334.
- Wihastuti, T.A., Sargowo, D., Rohman, M.S. 2007. Efek Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) Dalam Menghambat Aktivasi NF- $\kappa$ B, Ekspresi TNF- $\alpha$  dan ICAM-1 Pada HUVECS Yang Dipapar LDL Teroksidasi. *Jurnal Kardiologi Indonesia* (28) : 181-188.

Wijaya, S. dan Darsono, F.L. 2005. Uji Daya Antikalkuli Perasan Buah Ketimun (*Cucumis sativus L.*) Terhadap Tikus Putih Jantan Dengan Metode Kalkuli. *Jurnal Farmasi Indonesia*, 16 (3) : 173-176.

Yacoeb, A.M., Nurjanah, Arifin, M., Sulistiono, W., dan Kristiono, S.S. 2010. Deskripsi Histologis dan Perubahan Komposisi Kimia Daun dan Tangkai Semanggi (*Marsilea crenata*) Akibat Perebusan. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia* 12 (2) : 81-95.

Yadav, R.D., Jain, S.K., Alok, S., Mahor, A., Bharti, J.P., dan Jaiswal, M. 2011. Herbal Plants Used in The Treatment of Urolithiasis: A Review. *International Journal of Pharmaceutical Science and Research*: 1412-1420.

Yilmaz, H., Giizel, Y., Onal, Z., Altiparmak, G., dan Kocakaya, S.O. 2011. 4D-QSAR Study of p56 Protein Tyrosine Kinase Inhibitory Activity of Flavonoid Derivates Using MCET Method. *Korean Chemical Journal* 32 (12) : 4352-4360.



**Lampiran 1.** Determinasi semanggi air (*Marsilea crenata*)

 <b>DINAS KESEHATAN PROPINSI JAWA TIMUR</b> <b>UPT MATERIA MEDICA</b> Jalan Lahor No.87 Telp. (0341) 593396 Batu (65313) <b>KOTA BATU</b>
<p>Nomor : 074 / 037/B/ 101.8 / 2013 Sifat : Biasa Perihal : <u>Determinasi Tanaman Semanggi air</u></p> <p>Memenuhi permohonan saudara : Nama : JEFRI HARDIYANTO N I M : 0911310015 Fakultas : PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA</p> <p>1. Perihal determinasi tanaman semanggi air Kingdom : Plantae (Tumbuhan) Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh) Divisi : Pteridophyta (paku-pakuun) Kelas : Pteridopsida Ordo : Salvinales Famili : Marsilaceae Genus : Marsilea Spesies : <i>Marsilea crenata</i> Presl Sinonim : <i>Marsilea quadrifolia</i> Bl. ; <i>M. minuta</i> L. Indonesia : Semanggi, semanggen, paku tapak itik. Jawa : Semanggi Kunci Determinasi : 1a-17b-18a-1</p> <p>2. <b>Morfologi</b> : Habitus ; Sempak, menjalar, panjang ± 25 cm. Batang Lunak, berupa stolon, hijau kecoklatan. Daun Majemuk, tiap tangkai terdiri dari empat helai daun, lonjong, tepi rata, pangkal runcing, panjang ± 2 cm, lebar ± 1 cm, hijau. Spora : Sporocarpia terletak dekat pangkal tangkai daun, jepas/berdiri sendiri, kelopak dun, panjang 3-5 cm, lonjong, hijau, ungu. Akar : Serbut, putih kotor.</p> <p>3. <b>Nama Simplesia</b> : Marseleae crenatae Herba/ Herba semanggi air.</p> <p>4. <b>Kandungan Kimia</b> : daun dan batang mengandung saponin dan polifenol</p> <p>5. <b>Penggunaan</b> : Penelitian</p> <p>6. <b>Daftar Pustaka</b> : • Anonim, <a href="http://www.warintek.ristek.go.id/">http://www.warintek.ristek.go.id/</a> salam, Diakses 14 Februari 2007 • Anonim, <a href="http://www.plantamor.com/semanggi">http://www.plantamor.com/semanggi</a>, diakses 11 Desember 2010 • Steenis, CCGJ Van Dr., <i>FLORA</i>, 2008, Pradnya Paramita , Jakarta • Syamsuidayat, Sri sugati, Huttapea, Johny Ria, 1991, <i>Inventaris Tanaman Obat Indonesia I</i>, Departemen Kesehatan Republik Indonesia : Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan.</p> <p>Demikian determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.</p> <p>Batu, 11 Maret 2013 Kepala UPT Materia Medica Batu  Drs. Husin RM, Apt, MKes. NIP. 19611102-199103-1-003</p>

**Lampiran 2.** Sertifikat layak etik penelitian

 <p>KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN THE MINISTRY OF EDUCATION AND CULTURE FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA MEDICAL FACULTY BRAWIJAYA UNIVERSITY KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN THE ETHICAL COMMITTEE MEDICAL RESEARCH Jalan Veteran Malang - 65145 Telp. (0341) 551611 Pes. 213.214; 569117, 567192 – Fax. (62) (0341) 564755</p>	
<p><b>KETERANGAN KELAIKAN ETIK</b> ("ETHICAL CLEARANCE")</p> <p>No. 421 / EC / KEPK / 07 / 2013</p>	
<p>KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA, SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN :</p>	
JUDUL	: EFEK PREVENTIF PERASAN DAUN DAN TANGKAI SEMANGGI AIR ( <i>Marsilea crenata</i> ) TERHADAP UROLITHIASIS PADA TIKUS ( <i>Rattus norvegicus</i> ) GALUR WISTAR YANG DIINDUKSI ETILEN GLIKOL DAN AMONIUM KLORIDA
PENELITI UTAMA ANGGOTA	: Dr.drh.SRI MURWANI, MP drh.I.D.P ANOM ADNYANA JEFRI HARDYANTO LELYTA DAMAYANTI MARDIANA KUSUMAWATI SARTONO BONANZA WAHYU P
UNIT / LEMBAGA	: PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG
TEMPAT PENELITIAN	: KLINIK HEWAN PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG
DINYATAKAN LAIK ETIK	Malang, 01 AUG 2013. Ketua,  Prof. Dr. dr. Moch. Istiadjid ES, SpS, SpBS (K) M.Hum

**Lampiran 3.** Surat pernyataan payung penelitian

Saya yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Jefri Hardyanto

Nim : 0911310015

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Fakultas : Program Kedokteran Hewan

Universitas : Brawijaya

Menyatakan bahwa penelitian saya yang berjudul “Efek Perasan Daun Dan Tangkai Semanggi Air (*Marsilea crenata*) Terhadap Penurunan Kadar *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- $\alpha$ ) Dan *Interleukin 1 Beta* (IL-1 $\beta$ ) Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Urolithiasis” merupakan bagian dari penelitian yang berjudul “Efek Preventif Perasan Daun Dan Tangkai Semanggi Air (*Marsilea crenata*) Terhadap Urolithiasis Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Galur Wistar Yang Diinduksi Etilen Glikol Dan Amonium Klorida”. Untuk itu kepemilikan dan hak publikasi menjadi hak milik dari peneliti utama Dr. Sri Murwani, drh. MP.

Malang, 18 September 2013

Yang membuat pernyataan,

**Jefri Hardyanto**  
NIM. 0911310015

**Lampiran 4.** Uji Bartlett (Uji homogenitas berat badan awal tikus)

Uji Bartlett digunakan untuk menguji homogenitas varians lebih dari dua kelompok data. Langkah-langkah perhitungan homogenitas BB tikus:

**Tabel 1.** Berat badan awal tikus

Berat Badan Awal	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 4	Rata-rata
Kontrol (-) (P1)	170	143	145	130	147
Kontrol (+) (P2)	165	148	143	135	147,75
Perlakuan 1 (P3)	165	143	152	135	148,75
Perlakuan 2 (P4)	163	155	142	136	149
Perlakuan 3 (P5)	163	142	156	140	150,25
Perlakuan 4 (P6)	158	157	142	141	149,5

**Tabel 2.** Perhitungan varians setiap kelompok

Statistik	Kelompok Perlakuan					
	Kontrol (-) (P1)	Kontrol (+) (P2)	Perlakuan 1 (P3)	Perlakuan 2 (P4)	Perlakuan 3 (P5)	Perlakuan 4 (P6)
Rata-rata	147	147,75	148,75	149	150,25	149,5
Standar Deviasi	16,71327	12,68529	12,86792	12,24745	11,08678	9,255629
Varians	279,3333	160,9167	165,5833	150	122,9167	85,66667
$\Sigma$ Data	4	4	4	4	4	4
Dk	3	3	3	3	3	3

**Tabel 3.** Tabel penolong untuk uji homogenitas varians

Sampel	dk	1 / dk	si2	dk x si2	log si2	(dk) x log si2
Kontrol (-) (P1)	3	0,333333	279,3333	838	2,446123	7,338368292
Kontrol (+) (P2)	3	0,333333	160,9167	482,75	2,206601	6,619803083
Perlakuan 1 (P3)	3	0,333333	165,5833	496,75	2,219017	6,657049863
Perlakuan 2 (P4)	3	0,333333	150	450	2,176091	6,528273777
Perlakuan 3 (P5)	3	0,333333	122,9167	368,75	2,089611	6,268832323
Perlakuan 4 (P6)	3	0,333333	85,66667	257	1,932812	5,798435606
$\Sigma$ total	18			2893,25	13,07025	39,21076294

**Perhitungan Varians Gabungan**

$$\begin{aligned}s^2 &= \sum (dk s_i^2) / \sum dk \\ &= 2893,25 / 18 \\ &= 160,736\end{aligned}$$

**Perhitungan Nilai B**

$$\begin{aligned}B &= (\sum dk) \log s^2 \\ &= 18. \log 160,736 \\ &= 39,71\end{aligned}$$

**Perhitungan Harga Chi-Kuadrat**

$$\begin{aligned}\chi^2_{\text{hitung}} &= (\ln 10) \{ B - \sum dk \log s_i^2 \} \\ &= (\ln 10) \{ 39,71 - 39,21076294 \} \\ &= 2,303 \times 0,49923706 \\ &= 1,149742949 \\ \chi^2_{\text{tabel}} 0,05 (dk) &= \chi^2_{\text{tabel}} 0,05 (3) \\ &= 7,81473\end{aligned}$$

Untuk  $\alpha = 5\%$ , dari daftar distribusi  $\chi^2$  dengan  $dk=3$  didapat  $\chi^2_{0,95(3)} = 7,81473$ , ternyata bahwa  $\chi^2_{\text{hitung}} = 1,149742949 < \chi^2_{0,95(3)} = 7,81473$  sehingga hipotesis yang menyatakan varians homogen diterima dalam taraf  $\alpha = 5\%$ .

**Lampiran 5.** Perhitungan dosis bahan induksi urolithiasis

Dosis = 12 ml/200g BB/hari

Etilen Glikol 0,75% + Amonium Klorida 2% + Aquadest = 12 ml

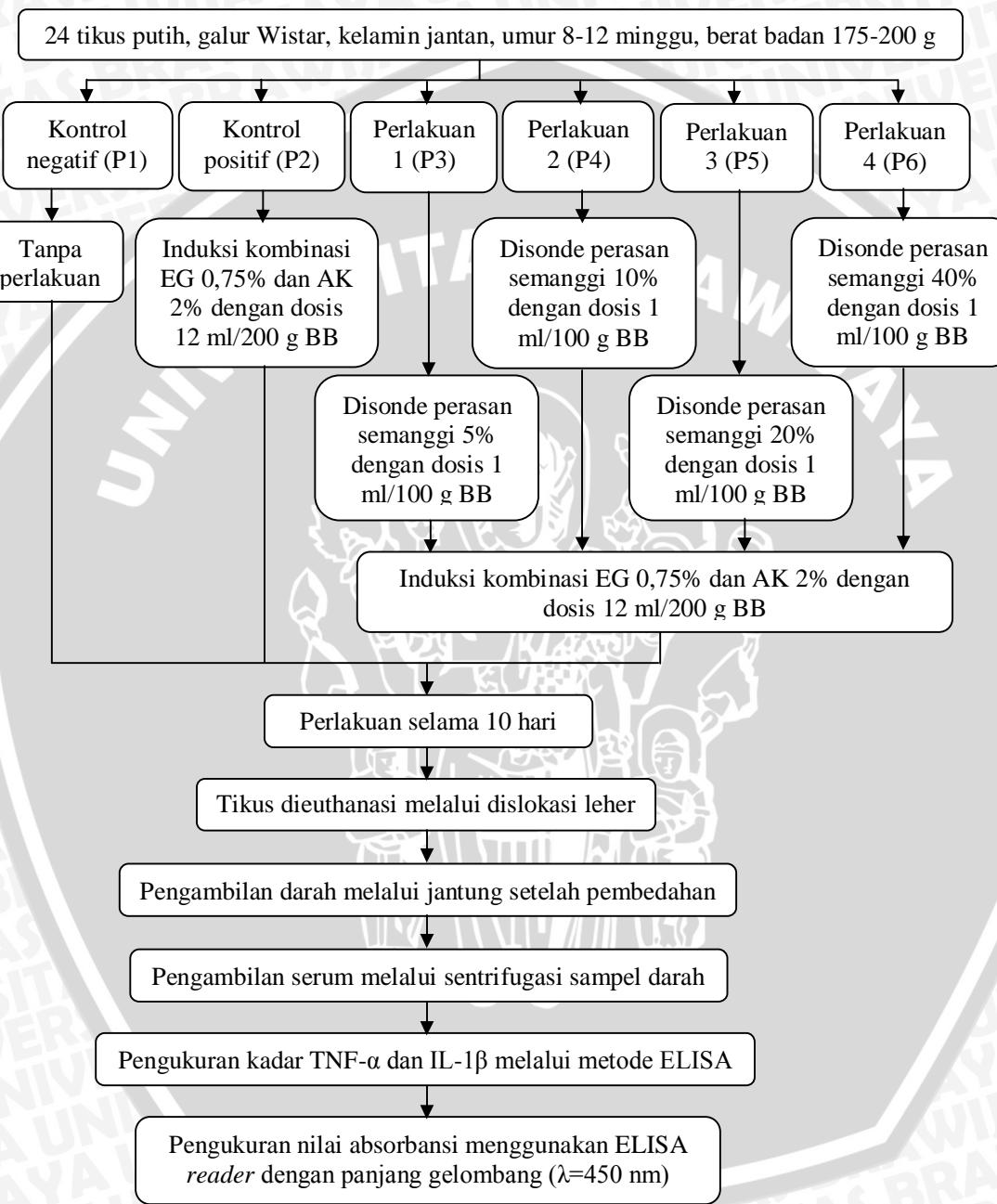
Etilen Glikol 0,75% =  $0,75/100 \times 12 = 0,09$  ml

Amonium Klorida 2% =  $2/100 \times 12 = 0,24$  ml

dikonversi menjadi gram  $0,24 \times 0,9 = 0,216$  g

Jadi, induksi hanya 1x sonde saja, yang terpenting kandungan etilen glikol 0,75% & amonium klorida 2% masuk ke tubuh, hanya pelarutnya saja yang dikurangi.



**Lampiran 6.** Diagram tahapan penelitian

**Lampiran 7.** Berat badan hewan coba selama pemeliharaan**Tabel 1.** Berat badan hewan coba selama pemeliharaan

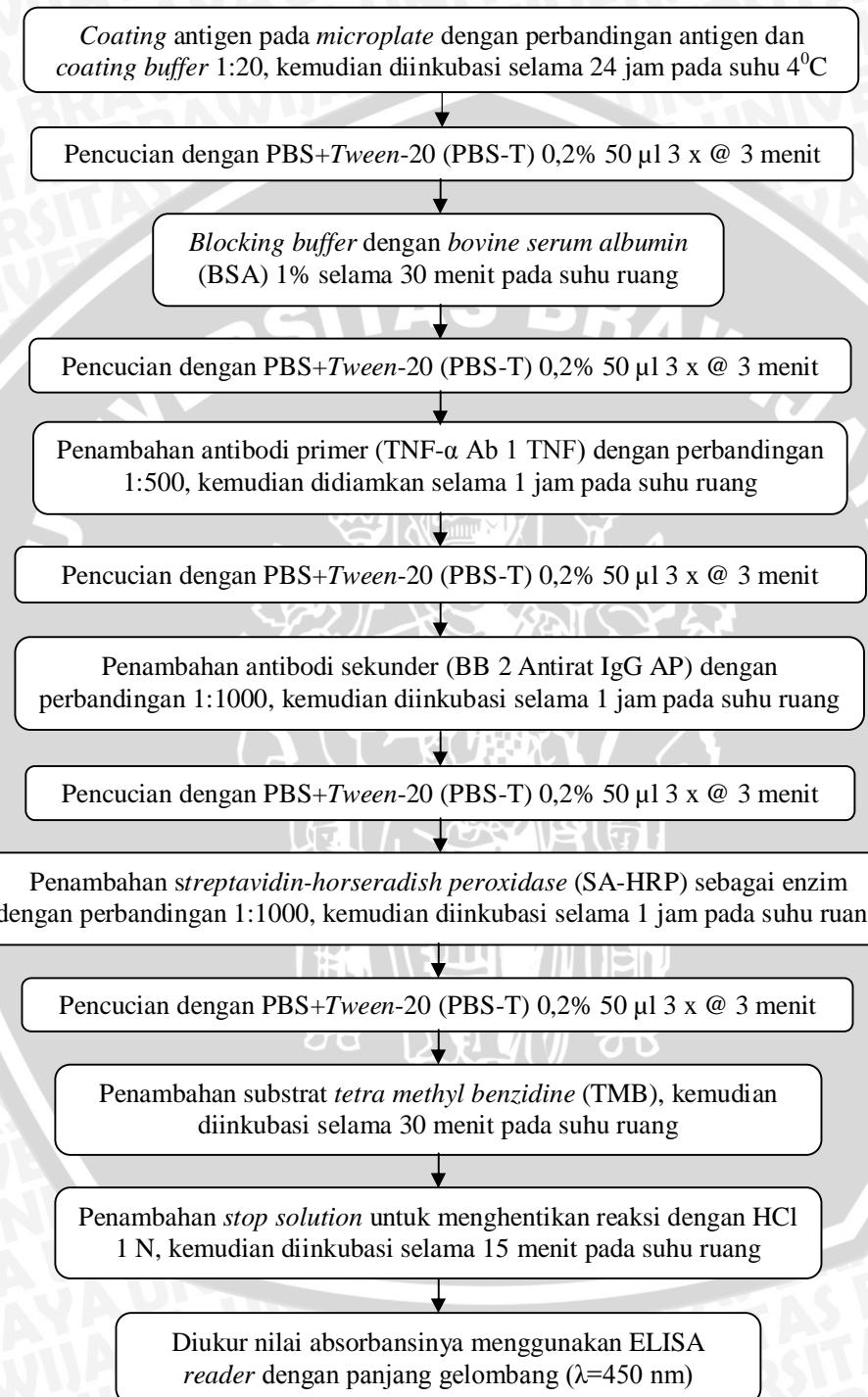
P	U	Awal	Setelah Adaptasi	Berat Badan Tikus Hari Ke-								
				2	3	4	5	6	7	8	9	10
K (-)	1	170	200	202	204	203	205	206	205	208	210	211
	2	143	180	182	181	183	184	185	187	190	189	190
	3	145	182	184	186	185	187	188	187	190	192	193
	4	130	175	177	176	178	179	180	182	185	184	185
K (+)	1	165	200	202	204	203	205	206	205	208	207	208
	2	148	184	186	185	187	188	189	191	194	196	197
	3	143	180	182	184	183	185	186	185	188	187	188
	4	135	175	177	176	178	179	180	182	185	187	188
P 1	1	165	195	197	199	198	200	201	200	203	205	206
	2	143	180	182	181	183	184	185	187	190	189	190
	3	152	182	184	186	185	187	188	187	190	189	190
	4	135	175	177	176	178	179	180	182	185	188	189
P 2	1	163	193	195	197	196	198	199	198	201	203	204
	2	155	185	187	186	188	189	190	192	195	194	195
	3	142	178	180	182	181	183	184	183	186	188	189
	4	136	175	177	178	180	181	182	184	187	186	187
P 3	1	163	193	195	197	196	198	199	198	201	200	201
	2	142	178	180	179	181	182	183	185	188	190	191
	3	156	186	188	190	189	191	192	191	194	193	194
	4	140	176	178	177	179	180	181	183	186	188	189
P 4	1	158	188	190	192	191	193	194	193	196	195	196
	2	157	187	189	188	190	191	192	193	196	198	199
	3	142	178	180	182	181	183	184	183	186	185	186
	4	141	177	179	178	180	181	182	183	186	188	189

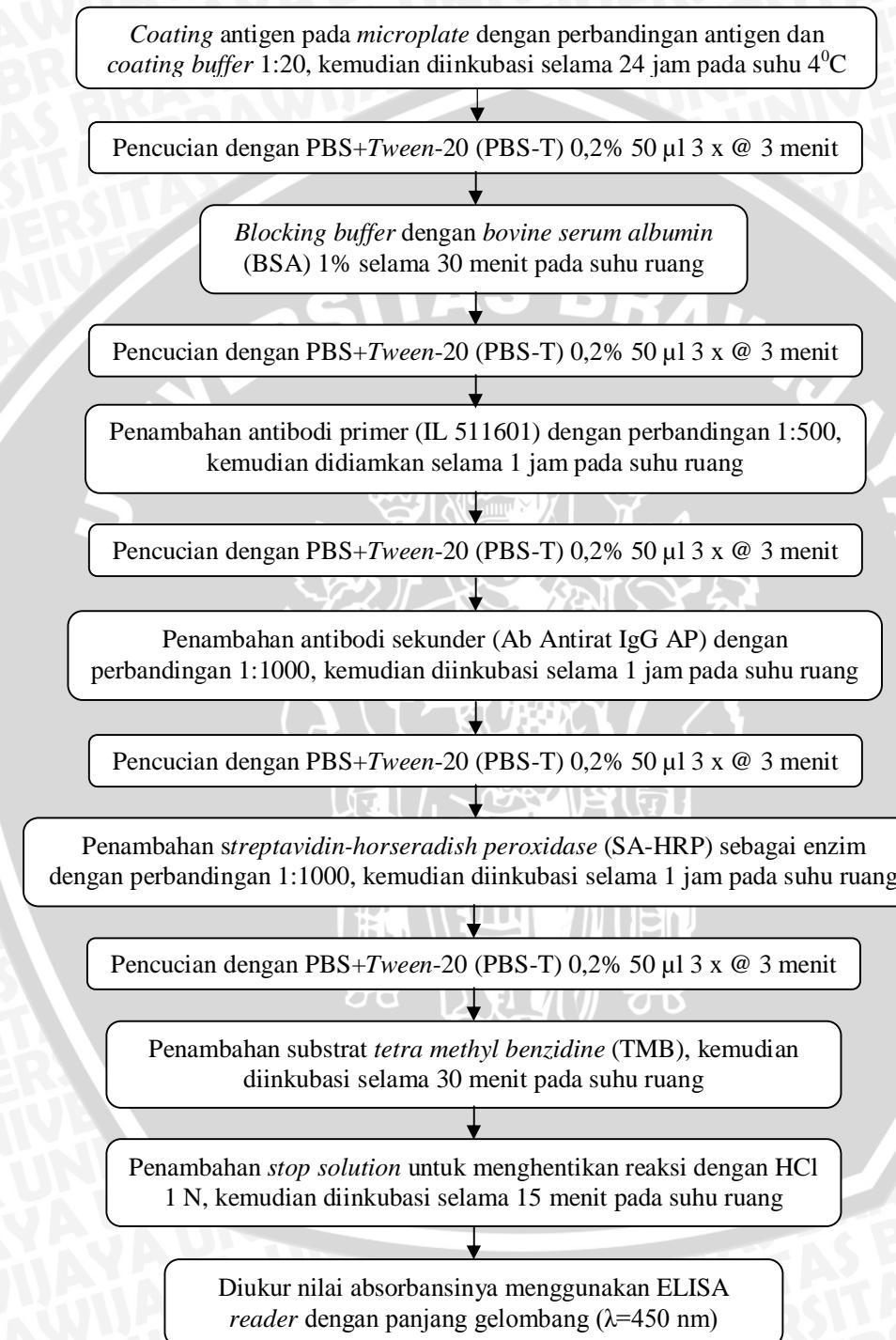
**Keterangan :**

P = Perlakuan

U = Ulangan

K = Kontrol

**Lampiran 8.** Prosedur pengukuran kadar TNF- $\alpha$  melalui metode ELISA

**Lampiran 9.** Prosedur pengukuran kadar IL-1 $\beta$  melalui metode ELISA

**Lampiran 10.** Hasil pengukuran kadar TNF- $\alpha$  melalui metode ELISA

**Tabel 1.** Hasil kadar TNF- $\alpha$

SAMPEL	NILAI ABSORBANSI	KADAR (ug/ml)
Kontrol (-) 1	0.375	42.000
Kontrol (-) 2	0.376	42.500
Kontrol (-) 3	0.377	43.000
Kontrol (-) 4	0.378	43.500
<b>Rata-rata kontrol (-) (P1)</b>		<b>42.750</b>
Kontrol (+) 1	0.474	91.500
Kontrol (+) 2	0.480	94.500
Kontrol (+) 3	0.481	95.000
Kontrol (+) 4	0.494	101.500
<b>Rata-rata kontrol (+) (P2)</b>		<b>95.625</b>
Perlakuan 1 1	0.442	75.500
Perlakuan 1 2	0.443	76.000
Perlakuan 1 3	0.449	79.000
Perlakuan 1 4	0.449	79.000
<b>Rata-rata perlakuan 1 (P3)</b>		<b>77.375</b>
Perlakuan 2 1	0.434	71.500
Perlakuan 2 2	0.439	74.000
Perlakuan 2 3	0.440	74.500
Perlakuan 2 4	0.442	75.500
<b>Rata-rata perlakuan 2 (P4)</b>		<b>73.875</b>
Perlakuan 3 1	0.419	64.000
Perlakuan 3 2	0.421	65.000
Perlakuan 3 3	0.422	65.500
Perlakuan 3 4	0.423	66.000
<b>Rata-rata perlakuan 3 (P5)</b>		<b>65.125</b>
Perlakuan 4 1	0.382	45.500
Perlakuan 4 2	0.385	47.000
Perlakuan 4 3	0.387	48.000
Perlakuan 4 4	0.390	49.500
<b>Rata-rata perlakuan 4 (P6)</b>		<b>47.500</b>

**Keterangan :** Hasil nilai absorbansi dikonversi menjadi kadar dengan rumus  
 $Y=0,002x+0,291$

**Lampiran 11.** Hasil pengukuran kadar IL-1 $\beta$  melalui metode ELISA

**Tabel 1.** Hasil kadar IL-1 $\beta$

SAMPEL	NILAI ABSORBANSI	KADAR (ng/ml)	KADAR (ug/ml)
Kontrol (-) 1	1.357	928.227	0.928
Kontrol (-) 2	1.398	965.500	0.966
Kontrol (-) 3	1.363	933.682	0.934
Kontrol (-) 4	1.419	984.591	0.985
<b>Rata-rata kontrol (-) (P1)</b>			<b>0.953</b>
Kontrol (+) 1	2.540	2003.682	2.004
Kontrol (+) 2	2.593	2051.864	2.052
Kontrol (+) 3	2.612	2069.136	2.069
Kontrol (+) 4	2.697	2146.409	2.146
<b>Rata-rata kontrol (+) (P2)</b>			<b>2.068</b>
Perlakuan 1 1	2.130	1630.955	1.631
Perlakuan 1 2	2.142	1641.864	1.642
Perlakuan 1 3	2.201	1695.500	1.696
Perlakuan 1 4	2.225	1717.318	1.717
<b>Rata-rata perlakuan 1 (P3)</b>			<b>1.671</b>
Perlakuan 2 1	2.127	1628.227	1.628
Perlakuan 2 2	2.146	1645.500	1.646
Perlakuan 2 3	2.159	1657.318	1.657
Perlakuan 2 4	2.205	1699.136	1.699
<b>Rata-rata perlakuan 2 (P4)</b>			<b>1.658</b>
Perlakuan 3 1	1.658	1201.864	1.202
Perlakuan 3 2	1.671	1213.682	1.214
Perlakuan 3 3	1.713	1251.864	1.252
Perlakuan 3 4	1.731	1268.227	1.268
<b>Rata-rata perlakuan 3 (P5)</b>			<b>1.234</b>
Perlakuan 4 1	1.602	1150.955	1.151
Perlakuan 4 2	1.604	1152.773	1.153
Perlakuan 4 3	1.632	1178.227	1.178
Perlakuan 4 4	1.634	1180.045	1.180
<b>Rata-rata perlakuan 4 (P6)</b>			<b>1.166</b>

**Keterangan :** Hasil nilai absorbansi dikonversi menjadi kadar dengan rumus

$$Y=0,0011x+0,33595$$

**Lampiran 12.** Analisis statistik kadar TNF- $\alpha$  menggunakan SPSS 16**Tabel 1.** Uji normalitas*One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test*

		TNF- $\alpha$
N		24
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	6.70417E1
	Std. Deviation	1.849672E1
Most Extreme Differences	Absolute	.162
	Positive	.162
	Negative	-.105
Kolmogorov-Smirnov Z		.793
Asymp. Sig. (2-tailed)		.556

Hasil pengujian normalitas pada tabel *One Sample Kolmogorof Smirnof*

*Test* dengan nilai signifikansi (*p*) sebesar 0,556. Oleh karena nilai *p* > 0,05, maka *Ho* diterima dan dapat disimpulkan bahwa data yang digunakan mempunyai distribusi yang tersebar dengan normal.

**Tabel 2.** Uji homogenitas

Levene Statistic Test	df1	df2	Sig.
2.238	5	18	.095

Pada hasil pengujian menunjukkan nilai dari *Levene Test* sebesar 2,238 dengan nilai signifikansi sebesar 0,095 yang lebih besar dari *alpha* 0,05. Karena nilai *p* > 0,05, maka *Ho* diterima dan dapat disimpulkan bahwa data yang digunakan mempunyai ragam yang homogen. Pengujian dengan menggunakan ANOVA dapat dilanjutkan karena kedua asumsi sudah terpenuhi.

**Tabel 3.** Uji one way ANOVA

TNF- $\alpha$	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7784.458	5	1556.892	331.646	.000
Within Groups	84.500	18	4.694		
Total	7868.958	23			

Berdasarkan pada hasil analisis ANOVA didapatkan bahwa nilai F hitung sebesar 331,646 dan  $p = 0,000$ , sedangkan F tabel pada  $df_1 = 5$ ;  $df_2 = 18$  sebesar 2,77. Karena mempunyai nilai  $p < 0,05$  dan  $F_{hitung} > F_{tabel}$ , maka dapat diputuskan untuk tolak  $H_0$ , yang berarti bahwa terdapat perbedaan perlakuan yang signifikan antara perlakuan pada tingkat kepercayaan 5%. Karena terdapat perbedaan yang signifikan pada hasil ANOVA, maka dilakukan uji lanjutan (*Posthoc Test*) menggunakan uji beda nyata jujur (BNJ) atau *Tukey Test*.



**Tabel 4.** Uji lanjutan (*posthoc test*) menggunakan *tukey test*

(I) Tikus	(J) Tikus	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol (-) (P1)	Kontrol (+) (P2)	-52.875000*	1.532065	.000	-57.74396	-48.00604
	Perlakuan 1 (P3)	-34.625000*	1.532065	.000	-39.49396	-29.75604
	Perlakuan 2 (P4)	-31.125000*	1.532065	.000	-35.99396	-26.25604
	Perlakuan 3 (P5)	-22.375000*	1.532065	.000	-27.24396	-17.50604
	Perlakuan 4 (P6)	-4.750000	1.532065	.058	-9.61896	.11896
	Kontrol (+) (P2)	52.875000*	1.532065	.000	48.00604	57.74396
	Perlakuan 1 (P3)	18.250000*	1.532065	.000	13.38104	23.11896
	Perlakuan 2 (P4)	21.750000*	1.532065	.000	16.88104	26.61896
	Perlakuan 3 (P5)	30.500000*	1.532065	.000	25.63104	35.36896
	Perlakuan 4 (P6)	48.125000*	1.532065	.000	43.25604	52.99396
Perlakuan 1 (P3)	Kontrol (-) (P1)	34.625000*	1.532065	.000	29.75604	39.49396
	Kontrol (+) (P2)	-18.250000*	1.532065	.000	-23.11896	-13.38104
	Perlakuan 2 (P4)	3.500000	1.532065	.250	-1.36896	8.36896
	Perlakuan 3 (P5)	12.250000*	1.532065	.000	7.38104	17.11896
	Perlakuan 4 (P6)	29.875000*	1.532065	.000	25.00604	34.74396
	Perlakuan 2 (P4)	31.125000*	1.532065	.000	26.25604	35.99396
Perlakuan 2 (P4)	Kontrol (+) (P2)	-21.750000*	1.532065	.000	-26.61896	-16.88104
	Perlakuan 1 (P3)	-3.500000	1.532065	.250	-8.36896	1.36896
	Perlakuan 3 (P5)	8.750000*	1.532065	.000	3.88104	13.61896
	Perlakuan 4 (P6)	26.375000*	1.532065	.000	21.50604	31.24396
	Perlakuan 3 (P5)	22.375000*	1.532065	.000	17.50604	27.24396
	Kontrol (+) (P2)	-30.500000*	1.532065	.000	-35.36896	-25.63104
Perlakuan 3 (P5)	Perlakuan 1 (P3)	-12.250000*	1.532065	.000	-17.11896	-7.38104
	Perlakuan 2 (P4)	-8.750000*	1.532065	.000	-13.61896	-3.88104
	Perlakuan 4 (P6)	17.625000*	1.532065	.000	12.75604	22.49396
	Perlakuan 4 (P6)	4.750000	1.532065	.058	-.11896	9.61896
	Kontrol (+) (P2)	-48.125000*	1.532065	.000	-52.99396	-43.25604
	Perlakuan 1 (P3)	-29.875000*	1.532065	.000	-34.74396	-25.00604
Perlakuan 4 (P6)	Perlakuan 2 (P4)	-26.375000*	1.532065	.000	-31.24396	-21.50604
	Perlakuan 3 (P5)	-17.625000*	1.532065	.000	-22.49396	-12.75604

**Tabel 5.** Homogenous subsets

Kelompok Tikus	Ulangan	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Kontrol (-) (P1)	4	4.27500E1			
Perlakuan 4 (P6)	4	4.75000E1			
Perlakuan 3 (P5)	4		6.51250E1		
Perlakuan 2 (P4)	4			7.38750E1	
Perlakuan 1 (P3)	4			7.73750E1	
Kontrol (+) (P2)	4				9.56250E1
Sig.		.058	1.000	.250	1.000

**Tabel 6.** Notasi setiap perlakuan

Perlakuan	Rata-rata	Notasi
Kontrol (-) (P1)	42,750	a
Perlakuan 4 (P6)	47,500	a
Perlakuan 3 (P5)	65,125	b
Perlakuan 2 (P4)	73,875	c
Perlakuan 1 (P3)	77,375	c
Kontrol (+) (P2)	95,625	d

Untuk mengetahui lebih lanjut mengenai perbedaan perlakuan nilai rata-rata kelompok perlakuan tersebut dapat dilakukan uji lanjutan (*Posthoc Test*) menggunakan uji beda nyata jujur (BNJ) atau *Tukey Test*, adanya perbedaan nilai rata-rata antara kelompok perlakuan ditunjukkan jika perlakuan memiliki rata-rata yang terletak pada kolom berbeda. Perlakuan kelompok kontrol negatif memiliki perbedaan yang signifikan dengan kelompok perlakuan 3, 2, 1, dan kontrol positif karena berada dalam kolom yang berbeda, namun perlakuan kelompok kontrol negatif memiliki perbedaan yang tidak signifikan dengan kelompok perlakuan 4.

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Sig.	Keterangan
Kontrol (-) (P1)	Kontrol (+) (P2)	-52.875000*	.000	Berbeda Nyata
	Perlakuan 1 (P3)	-34.625000*	.000	Berbeda Nyata
	Perlakuan 2 (P4)	-31.125000*	.000	Berbeda Nyata
	Perlakuan 3 (P5)	-22.375000*	.000	Berbeda Nyata
Kontrol (+) (P2)	Perlakuan 4 (P6)	-4.750000	.058	Berbeda Tidak Nyata
	Kontrol (-) (P1)	52.875000*	.000	Berbeda Nyata
	Perlakuan 1 (P3)	18.250000*	.000	Berbeda Nyata
	Perlakuan 2 (P4)	21.750000*	.000	Berbeda Nyata
Perlakuan 1 (P3)	Perlakuan 3 (P5)	30.500000*	.000	Berbeda Nyata
	Perlakuan 4 (P6)	48.125000*	.000	Berbeda Nyata
	Kontrol (-) (P1)	34.625000*	.000	Berbeda Nyata
	Kontrol (+) (P2)	-18.250000*	.000	Berbeda Nyata
Perlakuan 2 (P4)	Perlakuan 2 (P4)	3.500000	.250	Berbeda Tidak Nyata
	Perlakuan 3 (P5)	12.250000*	.000	Berbeda Nyata
	Perlakuan 4 (P6)	29.875000*	.000	Berbeda Nyata
	Kontrol (-) (P1)	31.125000*	.000	Berbeda Nyata
Perlakuan 3 (P5)	Kontrol (+) (P2)	-21.750000*	.000	Berbeda Nyata
	Perlakuan 1 (P3)	-3.500000	.250	Berbeda Tidak Nyata
	Perlakuan 3 (P5)	8.750000*	.000	Berbeda Nyata
	Perlakuan 4 (P6)	26.375000*	.000	Berbeda Nyata
Perlakuan 4 (P6)	Kontrol (-) (P1)	22.375000*	.000	Berbeda Nyata
	Kontrol (+) (P2)	-30.500000*	.000	Berbeda Nyata
	Perlakuan 1 (P3)	-12.250000*	.000	Berbeda Nyata
	Perlakuan 2 (P4)	-8.750000*	.000	Berbeda Nyata
	Perlakuan 4 (P6)	17.625000*	.000	Berbeda Nyata
	Kontrol (-) (P1)	4.750000	.058	Berbeda Tidak Nyata
	Kontrol (+) (P2)	-48.125000*	.000	Berbeda Nyata
	Perlakuan 1 (P3)	-29.875000*	.000	Berbeda Nyata
	Perlakuan 2 (P4)	-26.375000*	.000	Berbeda Nyata
	Perlakuan 3 (P5)	-17.625000*	.000	Berbeda Nyata

**Lampiran 13.** Analisis statistik kadar IL-1 $\beta$  menggunakan SPSS 16**Tabel 1.** Uji normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		IL-1 $\beta$
N		24
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	1.45825
	Std. Deviation	.385322
Most Extreme Differences	Absolute	.189
	Positive	.189
	Negative	-.170
Kolmogorov-Smirnov Z		.927
Asymp. Sig. (2-tailed)		.356

Hasil pengujian normalitas pada tabel *One Sample Kolmogorof Smirnof Test* dengan nilai signifikansi (*p*) sebesar 0,356. Oleh karena nilai *p* > 0,05, maka *H<sub>0</sub>* diterima dan dapat disimpulkan bahwa data yang digunakan mempunyai distribusi yang tersebar dengan normal.

**Tabel 2.** Uji homogenitas

Levene Statistic Test	df1	df2	Sig.
1.161	5	18	.366

Pada hasil pengujian menunjukkan nilai dari *Levene Test* sebesar 1,161 dengan nilai signifikansi sebesar 0,366 yang lebih besar dari *alpha* 0,05. Oleh karena nilai *p* > 0,05, maka *H<sub>0</sub>* diterima dan dapat disimpulkan bahwa data yang digunakan mempunyai ragam yang homogen. Pengujian dengan menggunakan ANOVA dapat dilanjutkan karena kedua asumsi sudah terpenuhi.

**Tabel 3.** Uji one way ANOVA

IL-1 $\beta$	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.391	5	.678	505.272	.000
Within Groups	.024	18	.001		
Total	3.415	23			

Berdasarkan pada hasil analisis ANOVA didapatkan bahwa nilai F hitung sebesar 505.272 dan  $p = 0,000$ , sedangkan F tabel pada  $df_1 = 5$ ;  $df_2 = 18$  sebesar 2,77. Karena mempunyai nilai  $p < 0,05$  dan  $F_{hitung} > F_{tabel}$ , maka dapat diputuskan untuk tolak  $H_0$ , yang berarti bahwa terdapat perbedaan perlakuan yang signifikan antara perlakuan pada tingkat kepercayaan 5%. Karena terdapat perbedaan yang signifikan pada hasil ANOVA, maka dilakukan uji lanjutan (*Posthoc Test*) menggunakan uji beda nyata jujur (BNJ) atau *Tukey Test*.



**Tabel 4.** Uji lanjutan (*posthoc test*) menggunakan *tukey test*

(I) Tikus	(J) Tikus	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol (-) (P1)	Kontrol (+) (P2)	-1.114500*	.025905	.000	-1.19683	-1.03217
	Perlakuan 1 (P3)	-.718250*	.025905	.000	-.80058	-.63592
	Perlakuan 2 (P4)	-.704250*	.025905	.000	-.78658	-.62192
	Perlakuan 3 (P5)	-.280750*	.025905	.000	-.36308	-.19842
	Perlakuan 4 (P6)	-.212250*	.025905	.000	-.29458	-.12992
	Kontrol (+) (P2)	1.114500*	.025905	.000	1.03217	1.19683
Perlakuan 1 (P3)	Kontrol (-) (P1)	.718250*	.025905	.000	.63592	.80058
	Kontrol (+) (P2)	-.396250*	.025905	.000	-.47858	-.31392
	Perlakuan 2 (P4)	.014000	.025905	.994	-.06833	.09633
	Perlakuan 3 (P5)	.437500*	.025905	.000	.35517	.51983
	Perlakuan 4 (P6)	.506000*	.025905	.000	.42367	.58833
	Perlakuan 2 (P4)	.704250*	.025905	.000	.62192	.78658
Perlakuan 3 (P5)	Kontrol (+) (P2)	-.410250*	.025905	.000	-.49258	-.32792
	Perlakuan 1 (P3)	-.014000	.025905	.994	-.09633	.06833
	Perlakuan 3 (P5)	.423500*	.025905	.000	.34117	.50583
	Perlakuan 4 (P6)	.492000*	.025905	.000	.40967	.57433
	Perlakuan 4 (P6)	.280750*	.025905	.000	.19842	.36308
	Kontrol (+) (P2)	-.833750*	.025905	.000	-.91608	-.75142
Perlakuan 4 (P6)	Perlakuan 1 (P3)	-.437500*	.025905	.000	-.51983	-.35517
	Perlakuan 2 (P4)	-.423500*	.025905	.000	-.50583	-.34117
	Perlakuan 4 (P6)	.068500	.025905	.137	-.01383	.15083
	Kontrol (-) (P1)	.212250*	.025905	.000	.12992	.29458
	Kontrol (+) (P2)	-.902250*	.025905	.000	-.98458	-.81992
	Perlakuan 1 (P3)	-.506000*	.025905	.000	-.58833	-.42367
	Perlakuan 2 (P4)	-.492000*	.025905	.000	-.57433	-.40967
	Perlakuan 3 (P5)	-.068500	.025905	.137	-.15083	.01383

**Tabel 5.** Homogenous subsets

Kelompok Tikus	Ulangan	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Kontrol (-) (P1)	4	.95325			
Perlakuan 4 (P6)	4		1.16550		
Perlakuan 3 (P5)	4			1.23400	
Perlakuan 2 (P4)	4				1.65750
Perlakuan 1 (P3)	4				1.67150
Kontrol (+) (P2)	4				2.06775
Sig.		1.000	.137	.994	1.000

**Tabel 6.** Notasi setiap perlakuan

Perlakuan	Rata-rata	Notasi
Kontrol (-) (P1)	0,9533	a
Perlakuan 4 (P6)	1,1655	b
Perlakuan 3 (P5)	1,2340	b
Perlakuan 2 (P4)	1,6575	c
Perlakuan 1 (P3)	1,6715	c
Kontrol (+) (P2)	2,0678	d

Untuk mengetahui lebih lanjut mengenai perbedaan perlakuan nilai rata-rata kelompok perlakuan tersebut dapat dilakukan uji lanjutan (*Posthoc Test*) menggunakan uji beda nyata jujur (BNJ) atau *Tukey Test*. Adanya perbedaan nilai rata-rata antara kelompok perlakuan ditunjukkan jika perlakuan memiliki rata-rata yang terletak pada notasi yang berbeda. Perlakuan kelompok kontrol negatif memiliki perbedaan yang signifikan dengan kelompok perlakuan 4, 3, 2, 1, dan kontrol positif karena berada dalam notasi yang berbeda, namun kelompok perlakuan 4 dan 3 memiliki perbedaan yang tidak signifikan karena memiliki notasi yang sama.

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Sig.	Keterangan
Kontrol (-) (P1)	Kontrol (+) (P2)	-1.114500*	.000	Berbeda Nyata
	Perlakuan 1 (P3)	-.718250*	.000	Berbeda Nyata
	Perlakuan 2 (P4)	-.704250*	.000	Berbeda Nyata
	Perlakuan 3 (P5)	-.280750*	.000	Berbeda Nyata
	Perlakuan 4 (P6)	-.212250*	.000	Berbeda Nyata
	Kontrol (-) (P1)	1.114500*	.000	Berbeda Nyata
Kontrol (+) (P2)	Perlakuan 1 (P3)	.396250*	.000	Berbeda Nyata
	Perlakuan 2 (P4)	.410250*	.000	Berbeda Nyata
	Perlakuan 3 (P5)	.833750*	.000	Berbeda Nyata
	Perlakuan 4 (P6)	.902250*	.000	Berbeda Nyata
	Kontrol (-) (P1)	.718250*	.000	Berbeda Nyata
	Kontrol (+) (P2)	-.396250*	.000	Berbeda Nyata
Perlakuan 1 (P3)	Perlakuan 2 (P4)	.014000	.994	Berbeda Tidak Nyata
	Perlakuan 3 (P5)	.437500*	.000	Berbeda Nyata
	Perlakuan 4 (P6)	.506000*	.000	Berbeda Nyata
	Kontrol (-) (P1)	.704250*	.000	Berbeda Nyata
	Kontrol (+) (P2)	-.410250*	.000	Berbeda Nyata
	Perlakuan 1 (P3)	-.014000	.994	Berbeda Tidak Nyata
Perlakuan 2 (P4)	Perlakuan 3 (P5)	.423500*	.000	Berbeda Nyata
	Perlakuan 4 (P6)	.492000*	.000	Berbeda Nyata
	Kontrol (-) (P1)	.280750*	.000	Berbeda Nyata
	Kontrol (+) (P2)	-.833750*	.000	Berbeda Nyata
	Perlakuan 1 (P3)	-.437500*	.000	Berbeda Nyata
	Perlakuan 2 (P4)	-.423500*	.000	Berbeda Nyata
Perlakuan 3 (P5)	Perlakuan 4 (P6)	.068500	.137	Berbeda Tidak Nyata
	Kontrol (-) (P1)	.212250*	.000	Berbeda Nyata
	Kontrol (+) (P2)	-.902250*	.000	Berbeda Nyata
	Perlakuan 1 (P3)	-.506000*	.000	Berbeda Nyata
	Perlakuan 2 (P4)	-.492000*	.000	Berbeda Nyata
	Perlakuan 3 (P5)	-.068500	.137	Berbeda Tidak Nyata
Perlakuan 4 (P6)				

**Lampiran 11.** Dokumentasi penelitian



**Gambar 1.** Kandang tikus selama penelitian



**Gambar 2.** Kegiatan induksi tikus



**Gambar 3.** Pembuatan dosis perasan daun dan tangkai semanggi air



**Gambar 4.** Prosedur euthanasia tikus melalui dislokasi leher



**Gambar 5.** Pengambilan darah melalui jantung setelah pembedahan



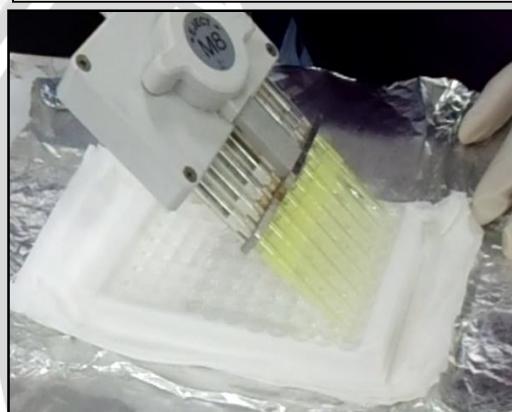
**Gambar 6.** Sentrifugasi sampel darah untuk mendapatkan serum darah



Gambar 7. Serum darah dalam *eppendorf*



Gambar 8. Prosedur coating antigen serum darah pada *microplate*



Gambar 9. Prosedur *washing*



Gambar 10. Prosedur antibodi - antigen



Gambar 11. Sampel siap diukur nilai absorbansinya



Gambar 12. ELISA reader