

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sistem kekebalan tubuh adalah sistem berskala besar yang terdiri dari gen, molekul, sel, dan organ, yang bekerja sama dalam jaringan interaksi kompleks yang bertujuan untuk memerangi berbagai macam ancaman terhadap organisme (Strzlec, M. et al. 2023). Pertahanan terhadap mikroba dimediasi oleh respons berurutan dan terkoordinasi yang disebut imunitas bawaan dan adaptif (L, Sun. et al. 2020). Saat ini, sitokin diketahui penting untuk imunitas bawaan dan adaptif, pertumbuhan sel, dan diferensiasi. Sitokin dapat diproduksi oleh sel T, fagosit mononuklear, atau oleh sel jaringan (Yuandani. 2020). Sitokin merupakan nama umum; nama lainnya meliputi limfokin (sitokin yang dibuat oleh limfosit), monokin (sitokin yang dibuat oleh monosit), kemokin (sitokin dengan aktivitas kemotaktik), dan interleukin (sitokin yang dibuat oleh satu leukosit dan bekerja pada leukosit lain). Sitokin dapat bekerja pada sel yang mengeluarkannya (aksi autokrin), pada sel di dekatnya (aksi parakrin), atau dalam beberapa kasus pada sel yang jauh (aksi endokrin) (Zhang, JM. Et al. 2007). IL-4 adalah sitokin yang bekerja pada banyak sel target yang berbeda yang mencakup sistem imun bawaan dan adaptif serta berasal dari berbagai sumber sel. IL-4 berperan sebagai faktor pertumbuhan sel B dan promotor peralihan kelas Ig yang meningkatkan produksi dan sekresi IgG (IgG1 tikus dan IgG4 manusia) dan IgE (Keegan AD. Et al. 2021). Di antara lima isotipe antibodi pada manusia dan tikus, antibodi imunoglobulin G (IgG) adalah isotipe antibodi antimikroba yang paling kuat karena waktu paruhnya yang panjang, kemampuannya untuk menembus hampir semua jaringan dan karena kemampuannya untuk memicu berbagai fungsi efektor (Hematianlarki M. 2024). Pada sel T, IL-4 menginduksi diferensiasi sel T CD4+ naif menjadi sel Th2 (Junttila IS. 2018). IL-4 juga berperan sebagai pengatur respons Th1 dan dapat menekan respons hipersensitivitas tipe lambat (DTH) (Yuandani, 2020). Hipersensitivitas tipe lambat merupakan reaksi tipe Th1 yang dimediasi oleh sel T CD4+ dan ditandai dengan onset yang lambat (Al-Ma'amouri, M. Y. 2023). Selama diferensiasi T helper, sinyal IL-4 menghambat diferensiasi sel T CD4+ naif menjadi efektor TH1 atau TH17 (Lazaerski CA. et al. 2013).

Respon imun yang memadai terhadap berbagai potensi bahaya menjadi mekanisme perlindungan bagi tubuh. Namun, malfungsi atau respon yang tidak terkendali dari respon imun dapat menyebabkan berkembangnya berbagai macam penyakit. Beberapa di antaranya bersumber dari proses peradangan kronis, sementara yang lain merupakan hasil dari penumpukan respons imun yang tidak normal terhadap sel-sel tertentu, sehingga mengarah pada perkembangan penyakit autoimun (Strzlec, M. et al. 2023). Dalam terapi pada gangguan sistem imun, modulasi respon imun oleh imunomodulator sangat penting (Yuandani. 2020). Ada berbagai target potensial dalam intervensi

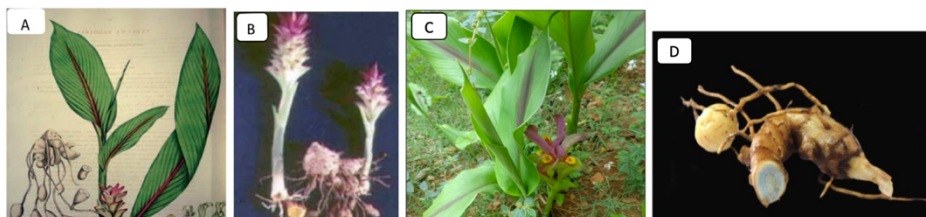
imunomodulasi yang secara efisien memodulasi respons imun pada berbagai tahapannya. Contoh yaitu terapi imunomodulasi yang sudah ada seperti kortikosteroid, obat antiinflamasi nonsteroid, antagonis histamin, dan interferon. Imunomodulasi belum sepenuhnya di eksplorasi dan dapat menjadi tambahan pengetahuan untuk mengatur beberapa perkembangan penyakit. Obat-obatan tradisional dari tanaman herbal menjadi salah satu sumber utama imunomodulator yang aman dan efektif (Strzlec, M. et al. 2023).

Banyak tanaman herbal dan olahannya yang dipraktikkan di rumah sebagai pengobatan untuk mengobati dan mencegah berbagai penyakit. Misalnya, tanaman obat dan bagian mentahnya seperti kemangi, nimba, kunyit, dan jahe digunakan untuk menyembuhkan atau mengobati beberapa penyakit. Salah satunya *Curcuma zedoaria* Rosc yang biasa dikenal sebagai temu putih merupakan salah satu obat tradisional yang termasuk dalam famili dan genus Zingiberaceae. Secara tradisional, *Curcuma zedoaria* telah dilaporkan memiliki banyak aktivitas biologis yang telah digunakan untuk banyak tindakan terapeutik karena adanya berbagai macam fitokonstituen di dalamnya (Gharge S. et al. 2021). Metabolit primer dan sekunder *Curcuma zedoaria* sangat beragam. Pati, kurkumin, minyak atsiri, dan gum arabic adalah bahan utama tumbuhan ini. (Budiansyah, A. 2023) Lebih dari sepuluh seskuiterpen ditemukan di rimpang *Curcuma zedoaria* antara lain kurkumin, etil p-metoksisinamat, turmeron, endemol, zingiberene, dihidro kurkumin, furanodiena, phellandrene, 1,8-cineole, elemen, dan germacrone. *Curcuma zedoaria* memiliki sejumlah aktivitas biologis yang mencakup antimikroba, antikanker, analgesik, antipiretik, antivirus, antioksidan, penyembuhan luka, antiinflamasi, aktivitas insektisida, dan aktivitas kardioprotektif serta aktivitas imunomodulator. Penelitian sebelumnya melaporkan aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol *Curcuma zedoaria* terhadap 8 bakteri patogen yaitu *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, *Bacillus magaterium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella boydi*, dan aktivitas anti jamur terhadap tiga spesies jamur yaitu *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*. (Gharge, S. 2021). Evaluasi studi toksisitas akut dari fraksi *Curcuma zedoaria* yang dimurnikan mengungkapkan bahwa fraksi pada dosis 41,6 dan 35,7 mg/kg tidak mengubah kadar enzim hati dan ginjal secara signifikan. LD50 adalah 500 mg/kg bb. Kurkumin merupakan senyawa utama yang terkandung pada semua *Curcuma* spesies termasuk *Curcuma zedoaria*. Aktivitas imunomodulasi kurkumin telah dibuktikan oleh banyak penelitian in vitro menggunakan beberapa sel imun. Kurkumin telah terbukti menghambat respons inflamasi dengan menekan COX-2 dan NO, NF- κ B, iNOS, dan lipoksigenase pada makrofag dan sel NK yang diaktifkan oleh IFN- γ atau TNF- α . Kurkumin juga meningkatkan produksi ROS dari monosit dan makrofag hati yang distimulasi oleh asam linoleat serta produksi TNF- α dari monosit yang diinduksi leptin dan pelepasan IFN- γ dari sel T CD4+. Sebuah penelitian sebelumnya melaporkan bahwa kurkumin menunjukkan efek

imunomodulatori pada tikus asma diabetes komorbid dengan mengurangi jumlah eosinofil dan kadar IL-4 dengan rasio IFN- γ terhadap IL-4 yang tinggi dalam darah dan bronkoalveolar setelah injeksi ovalbumin. (Yuandani. 2021). Pada penelitian sebelumnya, hanya pelarut etanol atau metanol (MeOH) digunakan untuk mengekstraksi fitokimia dari rimpang *Curcuma zedoaria* (Budiansyah A. 2023). Ekstraksi etanol pada suhu 30 °C selama 1 jam dengan rasio sampel terhadap padatan 8:1 menghasilkan rendemen tertinggi. Oleh karena itu, etanol adalah pelarut organik yang paling baik untuk mengekstraksi kurkumin. Selain itu, pelarut dengan kandungan etanol memberikan hasil signifikan dalam efisiensi ekstraksi. (Manasa, P.S.L. 2023).

Dengan menggunakan tikus putih jantan dari galur Wistar, penelitian ini dapat memberikan hasil yang lebih stabil karena tidak dipengaruhi oleh siklus estrus dan kehamilan. Selain itu, tikus lebih mudah dikontrol dari segi asupan makanan dan aktivitas fisik, yang mengurangi bias selama penelitian. Selain itu, homogenitas genetik tikus Albino Wistar memungkinkan peneliti menggunakannya sebagai model hewan standar untuk berbagai bidang penelitian terutama mempelajari tatalaksana atau obat baru, sehingga penting untuk memastikan bahwa setiap perubahan yang diamati semata-mata disebabkan oleh intervensi dan bukan perbedaan genetika antara subjek. Tikus-tikus ini secara alami jinak dan jarang merasa stres ketika dicakar atau diangkat, dan oleh karena itu, dan menjadi pilihan yang sempurna bagi peneliti yang harus mengambil sampel darah atau melakukan metode invasif pada subjeknya (Krubaa, P. 2024).

Meskipun berbagai jenis *Curcuma* sudah banyak diteliti, *Curcuma zedoaria*



Gambar 1. 1 *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe A. Ilustrasi; B. Tangkai bunga dengan rimpang; (Silalahi, M. 2020) C. Daun, tangkai dan bunga; D. Rimpang (Judhao, AS. 2019)

atau temu putih masih kurang dieksplorasi dalam literatur ilmiah. Mengingat prevalensi penyakit yang berhubungan dengan gangguan sistem imun, seperti penyakit autoimun, hipersensitivitas, dan infeksi kronis, pemahaman yang lebih mendalam mengenai sifat imunomodulator dari *Curcuma zedoaria* dapat membuka peluang bagi pengembangan terapi alternatif yang lebih aman dan efektif. Penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi efek imunomodulator ekstrak etanol *Curcuma zedoaria* terhadap produksi sitokin, antibodi dan hipersensitivitas tipe lambat (DTH) pada tikus wistar. Dengan mengeksplorasi pengaruh ekstrak etanol *Curcuma zedoaria* terhadap sitokin, antibodi, dan

hipersensistivitas tipe lambat (DTH), penelitian ini diharapkan berpotensi mengungkap mekanisme yang mendasari dampak imunomodulasi dari tanaman tersebut dan dapat memberikan wawasan baru tentang cara kerja senyawa aktif dalam *Curcuma zedoaria* dalam memodulasi sistem imun yang belum banyak dieksplorasi dalam konteks penelitian biomedik modern.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana efek immunomodulator ekstrak etanol *Curcuma zedoaria* terhadap sitokin, antibodi dan hipersensitivitas tipe lambat pada Tikus Wistar?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum :

Untuk mengetahui efek immunomodulator ekstrak etanol *Curcuma zedoaria* terhadap sitokin, antibodi dan hipersensitivitas tipe lambat pada Tikus Wistar.

1.3.2 Tujuan Khusus :

- a. Untuk mengetahui efek immunomodulator ekstrak etanol *Curcuma zedoaria* terhadap sitokin IL-4 pada Tikus Wistar
- b. Untuk mengetahui efek immunomodulator ekstrak etanol *Curcuma zedoaria* terhadap antibodi IgG pada Tikus Wistar
- c. Untuk mengetahui efek immunomodulator ekstrak etanol *Curcuma zedoaria* terhadap Hipersensitivitas tipe lambat pada Tikus Wistar

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

Memberikan keilmuan, acuan dan perbaruan terkait penelitian efek immunomodulator ekstrak etanol *Curcuma zedoaria* terhadap sitokin, antibodi dan hipersensitivitas tipe lambat pada tikus wistar.

1.4.2 Manfaat praktis

Memberikan dasar ilmiah kepada masyarakat bahwa temu putih (*C.Zedoaria*) dapat dimanfaatkan tidak hanya sebagai rempah pada makanan namun juga untuk kesehatan yaitu meningkatkan sistem imunitas tubuh.

1.5 Penelitian Pendukung

Beberapa penelitian yang menilai efek Immunomodulator terhadap

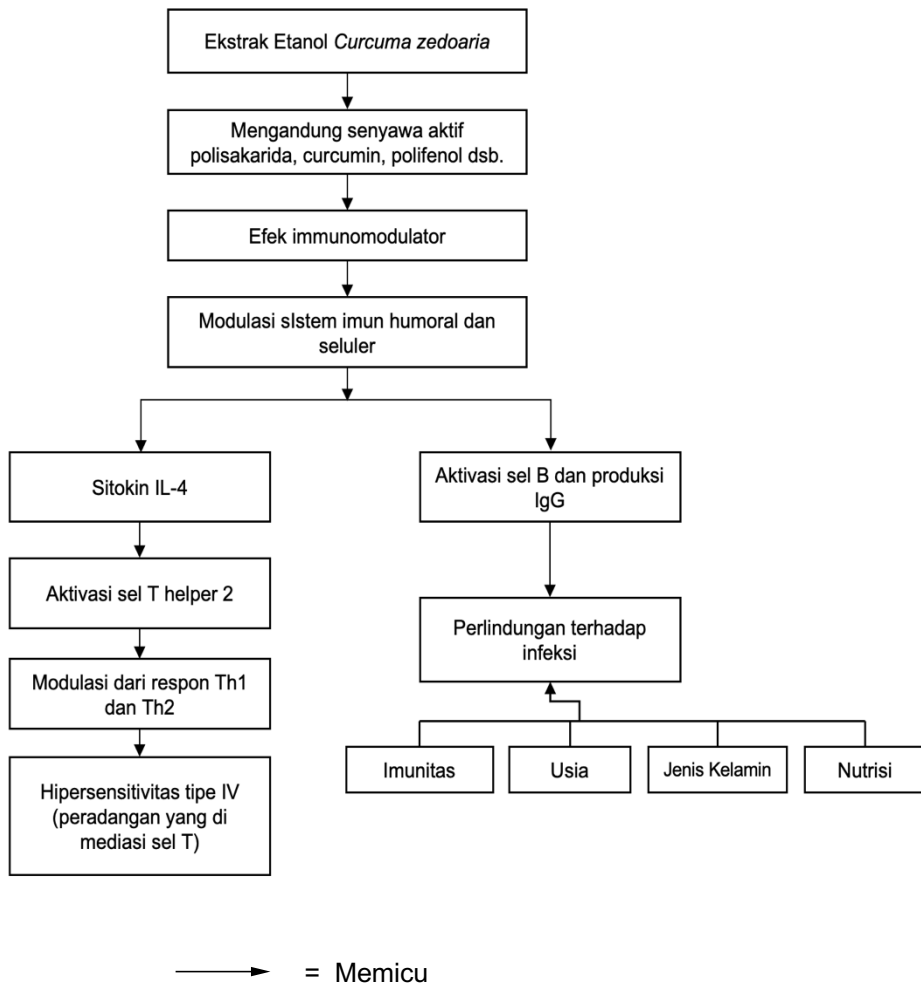
tanaman *Curcuma* sebagai berikut:

Tabel 1.1 Penelitian yang menilai efek Immunomodulator terhadap tanaman *Curcuma*

Nama Peneliti	Judul Penelitian	Temuan Penelitian
Yuandani, Nugaraha, Sony Eka., Laila, Lia., Satria, Denny. (2020)	Immunomodulatory effects of standardized extract of <i>Curcuma mangga</i> val. on cytokines, antibody and delayed-type hypersensitivity response in Wistar rats	Pada hasil menunjukkan adanya peningkatan produksi IgG pada tikus setelah terinfeksi <i>S.typhimurium</i> . Ekstrak <i>C. Mangga</i> juga mengurangi ekspresi gen sitokin inflamasi dan menurunkan produksi IL-4. Selain itu ketebalan telapak kaki pada tikus setelah perlakuan dengan dosis <i>C. mangga</i> yang berbeda lebih tinggi dibandingkan kontrol negatif ($P < 0,05$), yang berarti bahwa ekstrak <i>C. Mangga</i> meningkatkan respons hipersensitivitas tipe lambat dan dengan demikian menstimulasi imunitas seluler.
Yuandani., Jantan, Ibrahim., Rohami, Ade Sri., Sumantri. (2021)	Immunomodulatory Effects and Mechanisms of <i>Curcuma</i> Species and Their Bioactive Compounds: A Review	Ekstrak yang terstandar pada <i>Curcuma zedoaria</i> menghasilkan efek imunomodulasi.

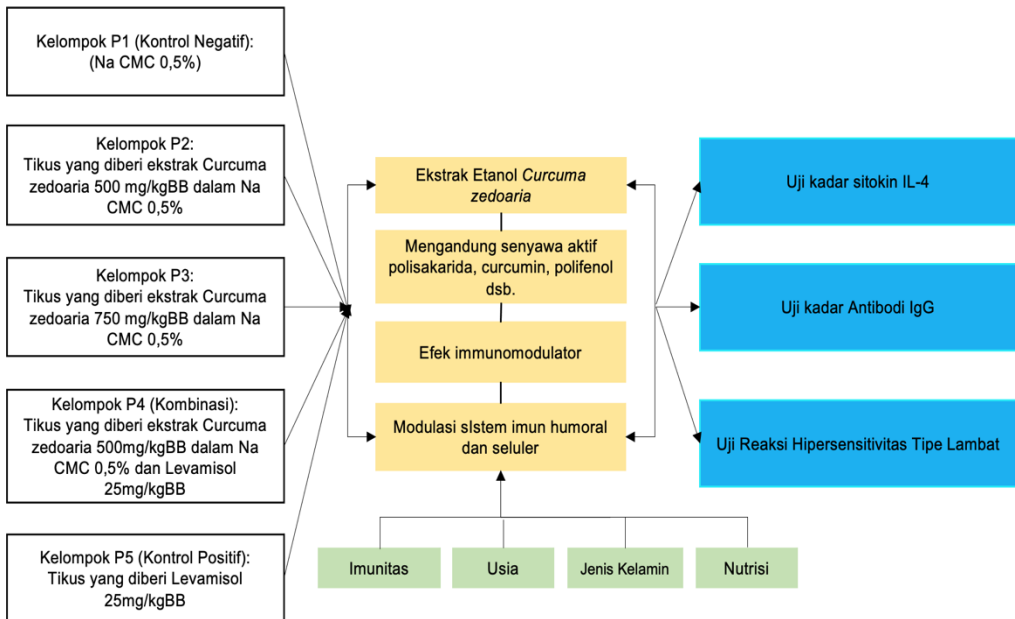
<p>Fajrin, Fifteen Aprila., Sulistyowaty, Melanny Ika., Ghiffary, Mohammad Labib. Dkk. (2023)</p>	<p>Immunomodulatory effect from ethanol extract and ethyl acetate fraction of <i>Curcuma heyneana</i> Valetton and Zijp: Transient receptor vanilloid protein approach</p>	<p>Penelitian in vivo menggunakan tikus menyimpulkan bahwa ekstrak etanol <i>Curcuma heyneana</i> Valetton dan Zijp (EETG) mempunyai aktivitas imunostimulan dengan meningkatkan nilai indeks fagositosis dan jumlah sel leukosit.</p>
<p>Yuandani, Ibrahim Jantan, Lia Laila, Marianne, Abdi wira Septama, Ngagami Lintang, Friti, Syarifaj A'ini. (2022)</p>	<p>Immunomodulatory Effects of Combined Ethanol Extracts of <i>Curcuma mangga</i> and <i>Picria fel-terrae</i> on Cellular- and Humoral-Mediated Immunity in Wistar Rats and Mice</p>	<p>Ekstrak gabungan menunjukkan stimulasi kuat pada respon DTH dan aktivitas fagositosis pada 100 mg/kg-bb, yang sebanding dengan kontrol positif, levamisol. Produksi IgG dan IgM serta pelepasan IL-2 juga distimulasi setelah pengobatan dengan ekstrak. Kombinasi ekstrak <i>C. mangga</i> dan <i>P. fel-terrae</i> memiliki aktivitas stimulasi yang kuat pada imunitas seluler dan humoral dan dapat dikembangkan sebagai nutraceutical potensial untuk modulasi respon imun.</p>
<p>Shankar Gharge, Sushmita I. Hiremath, Pooja Kagawad, Kadambari Jivaje, Mahesh S. Palled and Shailendra S. Suryawansh. (2021)</p>	<p><i>Curcuma zedoaria</i> Rosc (Zingiberaceae): a review on its chemical, pharmacological and biological activities</p>	<p>Investigasi ini menyimpulkan bahwa temu putih ditemukan memiliki rangkaian fitokonstituen kompleks seperti kurkumin, etil p-metoksisinamat, β-turmeron, β-eudesmol, zingiberene, dihydrocurcumin, furanodiene, α-phellandrene, 1–8 cineole, β-elemen dan germacrone. Karena adanya berbagai macam fitokonstituen, tumbuhan dilaporkan mempunyai aktivitas biologis yang beragam termasuk efek immunomodulator.</p>

1.6 Kerangka Teori

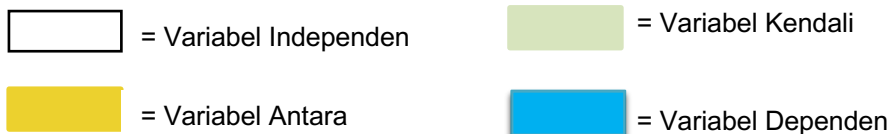


Gambar 1. 2 Kerangka Teori

1.7 Kerangka Konsep



Gambar 1.3 Kerangka Konsep



1.8 Hipotesis Penelitian

1. Ekstrak etanol *Curcuma zedoaria* dapat memodulasi kadar sitokin IL-4 pada tikus wistar.
2. Ekstrak etanol *Curcuma zedoaria* dapat memodulasi produksi IgG pada tikus wistar yang menunjukkan penguatan respon imun humoral dan pembentukan memori imun.
3. Ekstrak etanol *Curcuma zedoaria* meningkatkan volume telapak kaki tikus wistar setelah terinfeksi *S. aureus* yang menunjukkan peningkatan respon hipersensitivitas tipe lambat (DTH) pada sel imun tikus wistar.
4. Ekstrak etanol *Curcuma zedoaria* 500 mg/kgbb + levamisole 25mg/kgbb memiliki efek immunomodulator yang sama atau lebih baik dibandingkan dengan pemberian levamisole 25mg/kgbb saja pada tikus wistar.
5. Semakin tinggi dosis ekstrak etanol *Curcuma zedoaria*, semakin tinggi efeknya terhadap imunitas tikus wistar.

1.9 Definisi Operasional

1. Immunomodulator adalah efek dari ekstrak etanol *Curcuma zedoaria* yang memberikan modulasi pada sitokin IL-4, antibodi IgG dan hipersensitivitas tipe lambat pada tikus wistar.
2. Ekstrak Etanol *Curcuma zedoaria* adalah bagian dari rhizome/rimpang pada *Curcuma zedoaria* yang diambil dan dilakukan ekstrak cara maserasi dengan etanol 96% (1:10), kemudian pelarutnya dihilangkan menggunakan rotary evaporator.
3. Uji reaksi sitokin IL-4 adalah darah dari tikus yang diambil setelah perlakuan di hari ke-15 lalu serumnya digunakan untuk menguji kadar sitokin IL-4 menggunakan kit ELISA (BT LAB, Shanghai, China).
4. Uji reaksi antibodi IgG darah dari tikus yang diambil setelah perlakuan di hari ke-15 lalu serumnya digunakan untuk menguji kadar antibodi IgG menggunakan kit ELISA (BT LAB, Shanghai, China).
5. Reaksi Hipersensitivitas tipe lambat adalah pertambahan rata rata volume telapak belakang kaki tikus 24 jam setelah di sensitisasi dengan *Staphylococcus aureus* (1×10^8 sel/mL) secara subkutan di hari ke- 14.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Desain Penelitian

Penelitian bersifat animal eksperimental yang bertujuan untuk menganalisis efek immunomodulator ekstrak etanol *Curcuma zedoaria* terhadap sitokin, antibodi, dan hipersensitivitas tipe lambat pada tikus wistar.

2.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat penelitian : Laboratorium Animal, Zoonotic and Emerging Disease serta Laboratorium HUM-RC Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar, Sulawesi Selatan, Indonesia.

Waktu penelitian : Februari – Desember 2025.

2.3 Sampel Penelitian

2.3.1 Populasi Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) jantan.

2.3.2 Sampel Penelitian

Subjek penelitian ini yaitu Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) jantan dimana tikus wistar kemudian dikelompokkan sesuai dengan perlakuan, sebagai berikut:

1. P1 (Kontrol Negatif, Na CMC 0,5%)
2. P2 (Ekstrak *Curcuma zedoaria* 500mg/kgBB dalam Na CMC 0,5%)
3. P3 (Ekstrak *Curcuma zedoaria* 750mg/kgBB dalam Na CMC 0,5%)
4. P4 (Kelompok kombinasi, Ekstrak *Curcuma zedoaria* 500mg/kgBB dan levamisole 25mg/kgBB)
5. P5 (Kontrol Positif, Levamisol 25mg/kgBB)

Masing – masing kelompok perlakuan menggunakan 6 ekor tikus wistar. Angka tersebut diperoleh dari perhitungan jumlah sampel menurut Federer

$$\text{Rumus Federer} = (n-1) (t-1) \geq 15$$

Keterangan:

n: besar sampel tiap kelompok

t: jumlah kelompok

Menurut rumus Federer, banyaknya sampel yang diperlukan:

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

$$(n-1) (5-1) \geq 15$$

$$(n-1) \geq \frac{15}{4}$$

$$n-1 \geq 3,75$$

$$n \geq 4,67 \text{ (digenapkan menjadi 5)}$$

Berdasarkan perhitungan diatas maka jumlah sampel yang digunakan harus lebih besar atau sama dengan 5 ekor hewan uji, tiap kelompok dengan 1 ekor cadangan. Pada penelitian ini akan menggunakan 6 ekor hewan uji untuk masing – masing kelompok. Sehingga jumlah sampel yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 30 ekor tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan.

2.3.3 Kriteria Inklusi

1. Tikus belum pernah mendapat perlakuan
2. Tikus Berusia 2 – 3 bulan (Berat 120 – 200 gr)
3. Tikus tidak memiliki kelainan atau penyakit yang diderita

2.3.4 Kriteria Eksklusi

1. Tikus yang mati atau sakit saat perlakuan

2.4 Izin Penelitian dan Ethical Clearance

Izin penelitian diperoleh dengan persetujuan Komite Etik Penelitian Biomedik Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, Makassar dengan nomor persetujuan 241/UN4.6.4.5.31/PP36/2025 tertanggal 21 April 2025.

2.5 Prosedur Penelitian

Adapun prosedur penelitian pada penelitian ini yaitu merujuk pada penelitian Yuandani, et al (2019; 2022)

2.6 Pembuatan Ekstrak

Rimpang temu putih (*Curcuma zedoaria*) dibersihkan lalu dikeringkan pada suhu ruang (diangin- anginkan) lalu digiling dengan mesin penggiling, dan diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan etanol sebagai pelarut. Secara singkat bahan tanaman kering (500 g rimpang *Curcuma zedoaria*) dimaserasi dengan etanol 96% (1:10). Kemudian pelarutnya dihilangkan menggunakan rotary evaporator sehingga diperoleh ekstrak etanol rimpang *Curcuma zedoaria*. (Yuandani, 2020).

2.7 Persiapan Hewan Uji

Tikus wistar (*Rattus norvegicus*) diaklimatisasi selama 7 – 14 hari dalam kandang dan diberi pakan serta minum secara ad libitum. Pada kandang diberi serbuk gergaji sebagai alas yang diganti selama dua hari sekali. Tikus ditimbang dan diberi label sesuai perlakuan. Tikus yang digunakan berumur 2 – 3 bulan

dengan berat badan 120 – 200gr. Masing – masing kelompok terdiri dari 6 ekor tikus wistar jantan.

2.8 Persiapan Antigen

Satu mL aliquot *Staphylococcus aureus* diencerkan dengan kaldu nutrisi untuk memperoleh konsentrasi sel 1×10^8 sel/mL. Konsentrasi sel dihitung menurut metode turbidimetrik menggunakan spektrofotometer dengan kerapatan optik 530 nm sebagaimana tercantum dalam Farmakope Indonesia. Campuran disentrifugasi pada suhu 25°C selama 10 menit pada 10.000 rpm. Sel dipisahkan dan kemudian dicuci dengan 1 mL buffer fosfat salin (PBS). (Yuandani, 2022).

2.9 Perlakuan

Tikus wistar diberikan suspensi ekstrak *Curcuma zedoaria* dalam Na CMC 0,5% secara oral setiap pagi pada pukul 09:00 WITA selama 14 hari. Pada hari ke-3 tikus wistar di sensitisasi dengan *Staphylococcus aureus* (1×10^8 sel/mL) melalui injeksi intraperitoneal.

Pembagian kelompok berdasarkan perlakuan yang akan diberikan dijelaskan pada tabel 2.1.

Tabel 2. 1 Kelompok Berdasarkan Perlakuan yang akan Diberikan

No	Kelompok	Perlakuan	Tindak Lanjut
1.	P1 (Kontrol Negatif)	Diberikan Na CMC 0,5%	Uji kadar sitokin IL-4, IgG dan Reaksi Hipersensitivitas tipe lambat pada hari ke-15
2.	P2	Diberikan Suspensi Ekstrak <i>C. zedoaria</i> 500 mg/kgBB dalam Na CMC 0,5%	Uji kadar sitokin IL-4, IgG dan Reaksi Hipersensitivitas tipe lambat pada hari ke-15
3.	P3	Diberikan suspensi <i>Ekstrak C. zedoaria</i> 750 mg/kgBB dalam Na CMC 0,5%	Uji kadar sitokin IL-4, IgG dan Reaksi Hipersensitivitas tipe lambat pada hari ke-15
4.	P4 (Kombinasi)	Diberikan Suspensi Ekstrak <i>C. zedoaria</i> 500 mg/kgBB dalam Na CMC 0,5% dan levamisole 25mg/kgBB	Uji kadar sitokin IL-4, IgG dan Reaksi Hipersensitivitas pada hari ke-15

5.	P5 Kontrol Positif	Diberikan Levamisol 25mg/kgBB	Uji kadar sitokin IL-4, IgG dan Reaksi Hipersensitivitas pada hari ke-15
----	--------------------------	----------------------------------	---

Masing–masing kelompok perlakuan akan diuji kadar sitokin IL-4, antibodi IgG, dan respons hipersensitivitas tipe lambat sebagai indikator aktivitas imun humoral dan seluler, dengan metode yang mengacu pada penelitian Yuandani dkk. serta modifikasi metode sebelumnya oleh Ahirwal et al. yang telah digunakan dalam studi imunomodulasi.

2.10 Uji Kadar Sitokin IL-4 dan Antibodi IgG

Hewan diberi ekstrak etanol *Curcuma zedoaria* sesuai dosis tiap masing masing kelompok perlakuan 72 jam sebelum sensitisasi dengan *Staphylococcus aureus* (1×10^8 sel/mL) melalui injeksi intraperitoneal dan dilanjutkan hingga 14 hari. Sementara itu, kelompok kontrol negatif menerima Na CMC 0,5%. Kelompok kombinasi mendapatkan ekstrak etanol *Curcuma zedoaria* dosis 500mg/kgbb dalam Na CMC 0,5% dan Levamisol 25mg/kgBB. Levamisol digunakan sebagai kontrol positif pada dosis 25 mg/kgBB. Pada hari ke-15, darah diambil secara intra orbita dari masing- masing tikus sebanyak kurang lebih 2,5 ml lalu di sentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 15 menit. Serum kemudian diambil dan digunakan untuk penentuan kadar sitokin IL-4 dan IgG. Kit ELISA yang sesuai digunakan untuk mengukur kadar sitokin IL-4 dan antibodi IgG (Yuandani. 2020).

2.11 Reaksi Hipersensitivitas Tipe Lambat

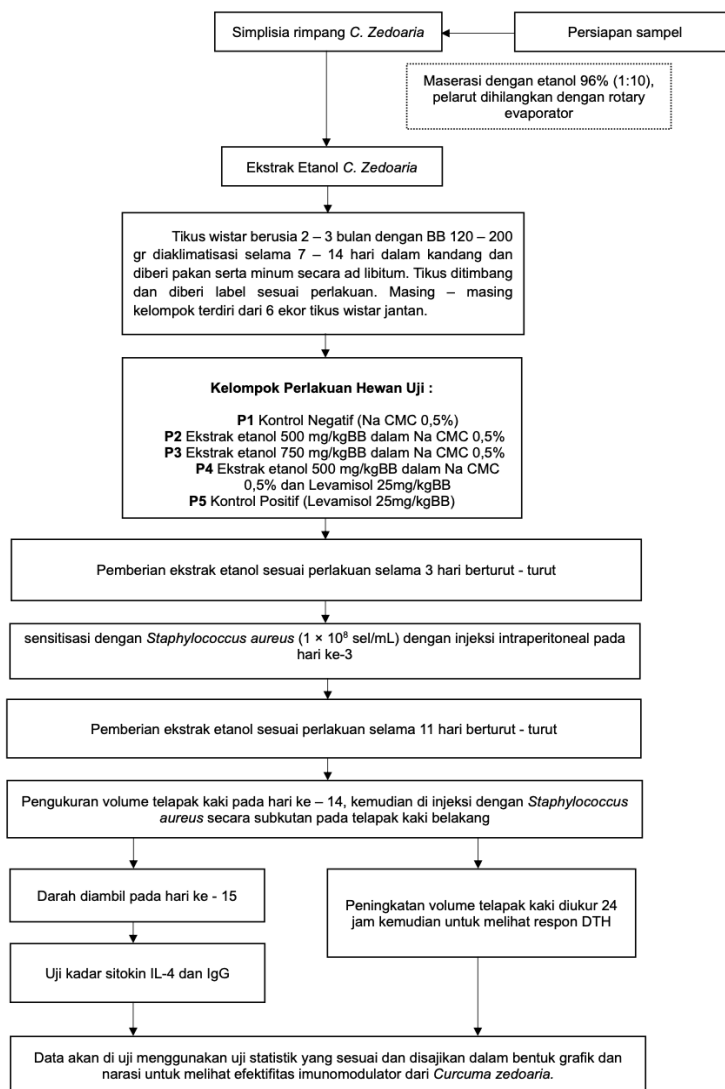
Uji ini dilakukan pada semua kelompok perlakuan. Hewan dibagi menjadi 5 kelompok untuk setiap kondisi. Suspensi ekstrak *Curcuma zedoaria* dalam Na CMC 0,5% sesuai dosis masing masing perlakuan diberikan secara oral kepada hewan 72 jam sebelum sensitisasi dengan *Staphylococcus aureus* (1×10^8 sel/mL) dengan injeksi intraperitoneal dan dilanjutkan hingga 14 hari. Sementara itu, kelompok kontrol negatif hanya menerima Na CMC 0,5%. Kelompok kombinasi mendapatkan ekstrak etanol *Curcuma zedoaria* dosis 500mg/kgbb dalam Na CMC 0,5% dan Levamisol 23mg/kgBB. Levamisol 25 mg/kg BB digunakan sebagai kontrol positif. Pada hari ke-14, volume telapak kaki diukur, kemudian semua tikus diinjeksi dengan *Staphylococcus aureus* secara subkutan pada telapak kaki belakang. Respons DTH diukur menggunakan plethysmometer 24 jam kemudian dan dinyatakan dengan peningkatan rata-rata volume telapak kaki (Yuandani. 2020, 2022).

2.12 Pengolahan dan Analisis Data

Data disajikan dalam bentuk grafik dan narasi untuk melihat efektifitas imunomodulator dari ekstrak etanol *Curcuma zedoaria*. Seluruh data diuji

normalitas dengan Saphiro-Wilk karena jumlah sampel yang kurang dari 50 sampel. Data yang berdistribusi normal dianalisis menggunakan *one-way* ANOVA. Apabila diperoleh hasil yang signifikan, analisis dilanjutkan dengan uji post hoc Dunnett untuk membandingkan masing-masing kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol negatif. Data yang tidak berdistribusi normal dianalisis dengan uji Kruskal Wallis, apabila signifikan dilanjutkan analisis menggunakan uji Mann–Whitney U secara berpasangan dengan koreksi Bonferroni. Semua data disajikan dalam bentuk rerata \pm standar deviasi (SD). Nilai $p < 0,05$ digunakan sebagai batas signifikansi statistik.

2.13 Alur Penelitian



Gambar 2.1 Alur Penelitian