

PENGARUH EKSTRAK *Moringa oleifera* TERHADAP EKSPRESI mRNA

IL-6 PADA OTAK *Rattus norvegicus* TERINDUKSI ETILEN GLIKOL

Syahrul Muflih Harahap*, Zahratul Idami, Leni Widiarti, Nurlian Augustin Ningrum

Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri

Sumatera Utara

Jl.Lap. Golf No.120, Kp. Tengah, Kec. Pancur Batu, Kabupaten Deli Serdang,

Sumatera Utara 20353

e-mail: syahrulhrp39@gmail.com

Abstrak

Etilen glikol (EG) merupakan senyawa toksik yang dapat menginduksi neuroinflamasi melalui peningkatan ekspresi interleukin-6 (IL-6), yaitu sitokin pro-inflamasi kunci. Ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dikenal memiliki aktivitas antioksidan dan anti-inflamasi, tetapi efeknya terhadap ekspresi IL-6 pada otak yang terpapar EG belum banyak diteliti. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis efek pemberian ekstrak daun kelor terhadap ekspresi mRNA IL-6 pada jaringan otak tikus yang diinduksi EG. Sebanyak 15 ekor tikus jantan galur Wistar dibagi menjadi 5 kelompok yaitu: kontrol normal (KN), kontrol negatif (K- induksi EG 0,75%), dan tiga kelompok perlakuan yang diberi ekstrak daun kelor dosis 150, 300, dan 450 mg/kgBB setelah induksi EG. Ekspresi mRNA IL-6 dianalisis menggunakan RT-PCR dan dievaluasi dengan ImageJ setelah normalisasi terhadap GAPDH. Induksi EG secara signifikan meningkatkan ekspresi mRNA IL-6 sebesar 2,34 kali lipat dibandingkan KN. Pemberian ekstrak dosis 150 mg/kgBB menurunkan ekspresi IL-6 hingga 1,50 kali lipat, menunjukkan efek anti-inflamasi optimal. Namun, pada dosis 300 dan 450 mg/kgBB, ekspresi IL-6 masing-masing menjadi 1,65 dan 2,08 kali lipat, menunjukkan respons yang tidak linear. Ekstrak daun kelor memiliki efek anti-inflamasi dalam menekan ekspresi mRNA IL-6, tetapi efek ini bersifat non-linear dan bergantung pada dosis. Dosis 150 mg/kgBB menunjukkan efektivitas tertinggi.

Kata Kunci: *Moringa oleifera*; etilen glikol; interleukin-6; neuroinflamasi; RT-PCR

Abstract

Ethylene glycol (EG) is a toxic compound that induces neuroinflammation by increasing the expression of interleukin-6 (IL-6), a key pro-inflammatory cytokine. *Moringa oleifera* leaf extract has antioxidant and anti-inflammatory activities, but its effect on IL-6 expression in the brain following EG exposure is underexplored. This study aimed to analyze the effect of *Moringa* leaf extract on IL-6 mRNA expression in the brain of EG-induced rats. Fifteen male Wistar rats were divided into 5 groups: normal control (KN), negative control (K- 0.75% EG), and three treatment groups receiving *Moringa* extract at 150, 300, and 450 mg/kg BW after EG induction. IL-6 mRNA expression was analyzed using RT-PCR and evaluated with ImageJ after normalization to GAPDH. EG induction significantly increased IL-6 mRNA expression by 2.34-fold compared to KN. The 150 mg/kg dose reduced IL-6 expression to 1.50-fold, showing optimal anti-inflammatory effects. However, at 300 and 450 mg/kg, IL-6 expression increased to 1.65 and 2.08-fold, respectively, indicating a non-linear response. *Moringa* leaf extract has an anti-inflammatory effect in suppressing IL-6 mRNA expression, but this effect is non-linear and dose-dependent. The 150 mg/kg dose showed the highest effectiveness.

Keywords: *Moringa oleifera*; ethylene glycol; interleukin-6; neuroinflammation; RT-PCR

1. PENDAHULUAN

Perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi di bidang biologi molekuler telah membuka peluang besar untuk memahami mekanisme penyakit hingga ke tingkat genetik. Salah satu area yang menarik untuk diteliti adalah peran sitokin dalam proses inflamasi dan kerusakan jaringan, termasuk pada otak. Otak merupakan organ paling kompleks dalam tubuh manusia dan hewan, berfungsi sebagai pusat kendali sistem saraf. Organ ini mengatur segala sesuatu mulai dari fungsi dasar seperti pernapasan dan detak jantung hingga proses kognitif tingkat tinggi seperti berpikir, belajar, dan memori (Intishar, 2023). Namun, otak merupakan organ yang rentan terhadap kerusakan akibat paparan zat beracun, termasuk etilen glikol (EG).

Etilen glikol (EG) ($C_2H_6O_2$) adalah senyawa organik yang banyak digunakan dalam berbagai industri, antara lain sebagai bahan antibeku (antifreeze), pelarut, dan bahan baku pembuatan polimer. Meskipun bermanfaat, EG tidak boleh dikonsumsi karena jika tertelan, terhirup, atau terserap melalui kulit maka dapat menyebabkan keracunan serius pada manusia dan hewan (Kurniawan & Hanifah, 2024). Ahli kimia dari Center for Disease Control and Prevention (CDC) di Atlanta mengidentifikasi dietilen glikol dalam sampel obat yang diproduksi secara lokal dan dikonsumsi. Etilen glikol (EG) menyebabkan gagal ginjal dan kerusakan otak parah selama beberapa hari (Nasir & Chalik, 2024). Di Indonesia, Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) telah mencatat kasus keracunan EG akibat pemalsuan bahan tambahan pangan, karena EG memiliki rasa manis dan harga yang lebih murah dibandingkan gliserol atau sorbitol (BPOM RI, 2023).

Secara kimiawi, etilen glikol (EG) sebenarnya tidak terlalu beracun dalam bentuk aslinya. Namun, ketika masuk ke dalam tubuh, etilen glikol mengalami metabolisme oleh enzim-enzim hati, terutama alkohol dehidrogenase dan aldehid dehidrogenase. Proses ini mengubah EG menjadi senyawa-senyawa turunan yang sangat beracun, seperti asam glikolat (*glycolic acid*) dan asam oksalat (*oxalic acid*). Asam oksalat kemudian dapat bereaksi dengan kalsium dalam tubuh membentuk kristal kalsium oksalat yang tidak larut. Kristal ini dapat mengendap di berbagai jaringan, termasuk ginjal, jantung, dan otak, menyebabkan kerusakan jaringan dan

gangguan fungsi organ (Simorangkir & Suharjono, 2023). Toksisitas EG biasanya berlangsung dalam tiga fase: fase neurologis (1-8 jam), fase kardiopulmonari (12-24 jam), dan fase ginjal (24-72 jam), meskipun manifestasinya seringkali tidak konsisten dan sangat bergantung pada jumlah EG yang dikonsumsi serta kecepatan intervensi medis (Simorangkir & Suharjono, 2023).

Dampak EG pada otak terjadi karena metabolitnya mampu melintasi sawar darah-otak (*blood-brain barrier*). Kristal kalsium oksalat yang mengendap di jaringan otak menjadi penyebab peradangan lokal, kerusakan sel, dan gangguan fungsi saraf. Selain itu, metabolit EG seperti asam glikolat memicu produksi spesies oksigen reaktif *Reactive Oxygen Species* (ROS) secara berlebihan, yang kemudian merusak lipid membran, protein, dan DNA (Manu et al., 2023). Kondisi stres oksidatif ini mengganggu fungsi normal sel saraf dan dapat menyebabkan kematian sel melalui apoptosis atau nekrosis. Pada kasus keracunan EG, peningkatan ekspresi sitokin pro-inflamasi, terutama interleukin-6 (IL-6), di otak menjadi indikator adanya respons inflamasi yang merugikan (Hu et al., 2020).

Interleukin-6 (IL-6) adalah sitokin pleiotropik multifungsi yang berperan sebagai mediator sentral dalam respons imun, inflamasi, hematopoiesis, metabolisme, dan homeostasis jaringan. IL-6 diproduksi oleh berbagai jenis sel, termasuk sel imun seperti makrofag, sel T, sel B, serta sel-sel di otak seperti mikroglia, astrosit, dan neuron (Ramona Sigit Prakoeswa et al., 2022). Dalam kondisi fisiologis normal, IL-6 berperan dalam neuroproteksi dan perbaikan jaringan. Namun, dalam kondisi patologis seperti paparan toksin, infeksi, atau stres oksidatif, produksi IL-6 dapat meningkat secara tidak terkendali dan menyebabkan neuroinflamasi kronis serta kerusakan saraf (Chen et al., 2018). Ekspresi IL-6 yang diukur melalui tingkat mRNA merupakan indikator kunci dari aktivasi respons inflamasi. Penelitian (Jiang et al., 2023) menunjukkan bahwa RT-PCR dapat digunakan untuk memantau perubahan ekspresi IL-6 dalam kondisi patologis pada otak dan jaringan perifer. Berdasarkan peran IL-6 dalam proses neuroinflamasi, diperlukan pendekatan terapeutik yang efektif untuk mengendalikan respon inflamasi tersebut.

Tanaman obat tradisional dapat menjadi salah satu alternatif potensial dalam

pengembangan agen terapeutik yang aman dan efektif. Oleh karena itu, diperlukan upaya pengembangan agen terapeutik yang mampu menekan respons neuroinflamasi secara aman dan efektif, salah satunya melalui pemanfaatan bahan alami yang memiliki aktivitas antiinflamasi. Daun dari tanaman kelor (*Moringa oleifera*) telah lama dikenal kaya akan berbagai manfaat kesehatan. Tanaman ini termasuk dalam famili Moringaceae dan sering disebut sebagai "pohon ajaib" karena setiap bagiannya, mulai dari akar, batang, daun, hingga bijinya, memiliki manfaat luas, baik sebagai obat, bahan pangan, produk kecantikan, maupun pupuk organik (Marhaeni, 2021). Daun kelor kaya akan senyawa bioaktif seperti flavonoid (quercetin, kaempferol, rutin), polifenol (asam klorogenat, asam galat), vitamin (A, C, E), mineral (kalsium, magnesium, kalium), serta glukosinolat, isotiosianat, saponin, tanin, dan alkaloid (Satriyani, 2021).

Senyawa-senyawa yang terkandung dalam daun kelor memiliki sifat antioksidan dan anti-inflamasi yang kuat. Flavonoid dan polifenol bekerja secara sinergis untuk menetralkan radikal bebas, mengurangi akumulasi ROS, dan meminimalkan kerusakan oksidatif pada sel. Kemampuan regeneratif ini memperkuat sistem pertahanan antioksidan endogen, sehingga meningkatkan ketahanan sel terhadap stres oksidatif. (Satriyani, 2021). Selain itu, ekstrak daun kelor juga diketahui mampu menghambat aktivasi jalur pensinyalan NF- κ B, yaitu faktor transkripsi yang mengendalikan ekspresi gen-gen pro-inflamasi seperti IL-6 (Cheng et al., 2019). Beberapa penelitian pada hewan coba menunjukkan bahwa ekstrak daun kelor dapat menurunkan kadar sitokin pro-inflamasi, termasuk IL-6, pada berbagai model penyakit (Girsang et al., 2019). Namun, hingga saat ini, belum banyak penelitian yang menginvestigasi efek ekstrak daun kelor terhadap ekspresi gen mRNA IL-6 secara spesifik pada otak tikus yang diinduksi etilen glikol. Oleh karena itu, diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengevaluasi efek ekstrak daun kelor terhadap ekspresi mRNA IL-6 pada model neuroinflamasi akibat induksi etilen glikol.

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan sebagai langkah untuk menganalisis ekspresi mRNA IL-6 dalam kaitannya dengan inflamasi pada otak tikus yang diinduksi etilen glikol, serta menjelaskan apakah terdapat korelasi antara pemberian

ekstrak daun kelor dengan inflamasi pada otak tikus akibat induksi etilen glikol. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan referensi baru tentang efek neurotoksik etilen glikol serta potensi daun kelor sebagai agen anti-inflamasi alami.

2. METODE PENELITIAN

2.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di tiga lokasi yang berbeda dimana, pemeliharaan hewan uji serta pemberian perlakuan dilakukan di Animal House Universitas Islam Negeri Sumatera Utara UINSU Medan. Pembuatan ekstrak daun kelor dan uji skrining fitokimia dilaksanakan di Laboratorium Chemistry UINSU Medan. Adapun analisis ekspresi gen mRNA IL-6 menggunakan teknik RT-PCR dilaksanakan di Laboratorium Genetika UINSU Medan. Ketiga laboratorium tersebut beralamat di Jl. Lapangan Golf No. 120 A, Kecamatan Medan Sunggal, Kota Medan, Sumatera Utara. Penelitian berlangsung dari bulan Mei 2025 hingga Agustus 2025.

2.2 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental berupa Rancangan Acak Lengkap (RAL). Sebanyak 15 ekor tikus putih jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) dengan bobot 180-250 gr, dengan rentang usia 2-3 bulan, dan telah diaklimatisasi selama 7 hari. Tikus putih tersebut dibagi secara acak ke dalam 5 kelompok perlakuan, sehingga masing-masing kelompok terdiri dari 3 ekor tikus. Berikut ini adalah pembagian kelompok perlakuan (Tabel 1):

Tabel 1. Pembagian Kelompok Perlakuan (KN,K-,P1,P2,P3)

Kode	Kelompok	Perlakuan
KN	Kontrol Normal	Pakan standar dan minum <i>ad libitum</i>
K-	Kontril Negatif	Induksi etilen glikol (EG) 0,75% <i>ad libitum</i> selama 30 hari
P1	Perlakuan 1	Induksi EG + ekstrak daun kelor 150 mg/kgBB (hari ke 11-30)
P2	Perlakuan 2	Induksi EG + ekstrak daun kelor 300 mg/kgBB (hari ke 11-30)
P3	Perlakuan 3	Induksi EG + ekstrak daun kelor 450 mg/kgBB (hari ke 11-30)

Induksi etilen glikol diberikan secara *ad libitum* melalui air minum pada 3 hari pertama, etilen glikol 0,75% dikombinasikan dengan amonium klorida (NH₄Cl) 1% guna mempercepat pembentukan kristal oksalat. Selanjutnya dari hari ke-4 hingga ke-30, tikus hanya mendapat etilen glikol 0,75%. Ekstrak daun kelor diberikan satu kali sehari secara oral (sonde lambung) mulai hari ke-11 hingga ke-30.

2.3 Pembuatan Ekstrak Daun Kelor

Daun kelor segar (*Moringa oleifera*) yang diambil dari daerah Tuntungan, Deli serdang, Sumatra Utara, selanjutnya diidentifikasi di Herbarium Medanense (MEDA) untuk memastikan kebenaran secara taksonominya. Daun kelor tersebut diambil sebanyak 5 kg dan dipisahkan dari rantingnya. Daun yang telah dipisahkan dari rantingnya tersebut selanjutnya dijemur hingga kering, dihaluskan dengan blender, dan diayak sehingga diperoleh simplisia halus sebanyak 500 gram. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:10 (100 gram simplisia dalam 1000 ml etanol) selama 3 hari dalam wadah tertutup. Hasil maserasi disaring, residu diremaserasi ulang dengan pelarut yang sama, dan semua filtrat dikumpulkan untuk diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 60°C hingga diperoleh ekstrak kental.

Selanjutnya, ekstrak daun kelor menjalani skrining fitokimia yang meliputi uji flavonoid (dengan NaOH 10%, pereaksi *Wilstater*, dan *Smith Metacalve*), uji alkaloid (pereaksi *Wagner* dan *Mayer*), uji saponin, serta uji tannin (Ola, 2020). Kadar total flavonoid ditentukan dengan metode spektrofotometri AlCl₃ menggunakan kurva kalibrasi kuersetin. Aktivitas antioksidan diuji menggunakan metode DPPH dengan mengukur persen inhibisi pada berbagai konsentrasi ekstrak, Semakin kecil nilai IC₅₀, semakin tinggi potensi antioksidan yang dimiliki oleh ekstrak tersebut (Fachriyah et al., 2020).

2.4 Persiapan dan Perlakuan Hewan Coba

Tikus putih Jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) sebanyak 15 ekor dengan bobot 180–250 gr dan usia 2–3 bulan diaklimatisasi selama 7 hari dalam kandang polipropilen berukuran 40×60 cm dengan pakan standar dan minum *ad libitum* untuk mengurangi stress sesuai dengan kode etik pemberlakuan kesejahteraan hewan. Larutan penginduksi dibuat dengan melarutkan 7,5 ml etilen glikol dalam

aquadest hingga 1000 mL untuk mendapatkan konsentrasi 0,75%, dan untuk 3 hari pertama ditambahkan amonium klorida (NH₄Cl) 1% guna mempercepat pembentukan kristal oksalat. Sediaan uji ekstrak daun kelor dibuat dengan melarutkan ekstrak kental dalam larutan Na-CMC 1% (dibuat dari 5 gram Na-CMC dalam 500 ml aquadest) hingga mencapai dosis 150, 300, dan 450 mg/kgBB, dengan volume pemberian per oral (sonde lambung) sebanyak 2 ml per tikus.

Dosis disesuaikan dengan bobot tikus (perkiraan 200 g), misalnya untuk dosis 150 mg/kgBB dibutuhkan 30 mg ekstrak per tikus yang dilarutkan dalam 2 ml Na-CMC 1%. Perlakuan dimulai dengan induksi etilen glikol 0,75% (dengan NH₄Cl 1% pada 3 hari pertama) secara *ad libitum* selama 30 hari. Ekstrak daun kelor diberikan satu kali sehari mulai hari ke-11 hingga ke-30. Pada hari ke-31, tikus dieuthanasia, otak bagian cerebrum diambil dengan alat bedah steril, dicuci dengan larutan PBS untuk menghilangkan darah dan debris, kemudian dimasukkan ke dalam tabung 1,5 mL berisi larutan preservasi RNA dan disimpan pada suhu -20°C hingga analisis lebih lanjut (Munawaroh et al., 2024).

2.5 Analisis Ekspresi mRNA IL-6

Sekitar 30 mg jaringan otak tikus pada bagian cerebrum diekstraksi dari menggunakan kit isolasi RNA (Favorgen), kemudian dilakukan pengecekan konsentrasi RNA serta kemurniannya (rasio A260/A280) diukur dengan spektrofotometer *NanoDrop* UV-Vis. Selanjutnya, sebanyak 1 µg RNA total disesuaikan volumenya berdasarkan konsentrasi masing-masing sampel yang akan digunakan untuk sintesis cDNA menggunakan kit *reverse transcription* II (SMOBIO). dengan campuran reaksi mengandung oligo(dT)/random primer, buffer RT mengandung DTT/dNTPs, dan enzim RTase/RI, melalui tahapan inkubasi pada suhu 70°C (5 menit), 25°C (4 menit), 50°C (50 menit), dan 85°C (5 menit). Adapun gen target yaitu IL-6 dan gen housekeeping GAPDH (Hu et al., 2020).

Tabel 2. Sequens Primer IL-6 dan GAPDH

Gen	Sequence
IL-6	<i>f</i> : 5'-GCCCTTCAGGAACAGCTATGA-3'
	<i>r</i> : 5'-TGTCACAACATCAGTCCCAAGA-3'

Gen	Sequence
GAPDH	<i>f</i> : 5'-ACAGTCCATGCCATCACTGCC-3' <i>r</i> : 5'-GCCTGCTTCACCACCTTCTTG-3'

Total volume untuk reaksi PCR ialah 50 µl terdiri dari cDNA setara 1 µg RNA awal, masing-masing primer 0,1–0,5 µM, dNTPs 0,2 mM, 10x Taq buffer, dan Taq DNA polimerase. Tahapan siklus PCR meliputi denaturasi awal 98°C (2 menit), 35 siklus denaturasi 94°C (30 detik), *annealing* 52,1°C (30 detik), *ekstension* 72°C (30 detik), dan *final ekstention* 72°C (1 menit). Hasil dari PCR sebanyak 8 µl dielektroforesis pada gel agarose dengan penambahan gel stain sebanyak 2 µl saat larutan agarose sedikit dingin dengan suhu 50-60°C aduk merata dan letakkan pada cetakan gel setelah itu pasangkan sisir lalu diamkan. Tempatkan gel ke dalam *tank* elektroforesis kemudian tambahkan buffer TBE 1x setelah itu pipet setiap sampel ke dalam sumur gel menggunakan mikropipet serta DNA *ladder*. Kemudian jalankan elektroforesis pada tegangan 100 V selama 30 menit setelahnya pita DNA divisualisasikan di bawah UV transilluminator dan didokumentasikan. Intensitas pita (*net intensity*) diukur menggunakan perangkat lunak *ImageJ*, kemudian nilai intensitas IL-6 dinormalisasi terhadap intensitas GAPDH untuk setiap sampel.

2.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini berupa pita yang sesuai dengan ukuran gen IL-6 sebagai ekspresi mRNA IL-6, kemudian pita gen housekeeping digunakan untuk kontrol normal. Hasil yang diperoleh dianalisis menggunakan software *imageJ* dilakukan hitung rasio intensitas pita IL-6 terhadap housekeeping, lakukan perbandingan ekspresi mRNA IL-6 antara kelompok kontrol, kelompok yang diinduksi etilen glikol, dan kelompok yang diberi ekstrak.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Karakteristik Ekstrak Daun Kelor

Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun kelor yang digunakan dalam penelitian ini positif mengandung flavonoid ditandai dengan perubahan warna menjadi merah-oranye dengan pereaksi *Wilstater*, alkaloid terlihat adanya endapan coklat dengan pereaksi *Wagner* dan endapan putih dengan pereaksi *Mayer*, saponin terdapat busa yang bertahan lama, dan tanin adanya bercak hijau

kehitaman. Keberadaan senyawa-senyawa ini sejalan dengan penelitian (Ola, 2020). Secara kuantitatif, kadar total flavonoid ekstrak diukur sebesar 34,3447 mg/gr ekstrak. Angka ini tergolong tinggi dan menunjukkan potensi antioksidan yang besar, mengingat flavonoid merupakan senyawa bioaktif utama sebagai penangkal radikal bebas.

Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH menghasilkan nilai IC₅₀ sebesar 53,2839 µg/ml. Menurut klasifikasi (Fachriyah et al., 2020) suatu ekstrak dikatakan memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat jika IC₅₀ kurang dari 50 µg/ml, kuat jika antara 50-100 µg/ml, sedang jika 100-150 µg/ml, dan lemah jika lebih dari 150 µg/ml. Dengan demikian, ekstrak daun kelor ini termasuk dalam kategori kuat hingga sangat kuat. Nilai IC₅₀ pada tiap daerah terdapat perbedaan. Perbedaan tersebut mungkin disebabkan oleh variasi asal tanaman, kondisi ekstraksi, atau pelarut yang digunakan. Tingginya aktivitas antioksidan ini menjadi dasar penting bagi kemampuan ekstrak dalam menetralkan radikal bebas yang dihasilkan oleh metabolisme etilen glikol di jaringan otak.

3.2 Kualitas dan Kuantitas RNA

Hasil pengukuran dengan spektrofotometer *Nanodrop* menunjukkan variasi konsentrasi dan kemurnian RNA antara sampel.

Tabel 3. Hasil Pemeriksaan Konsentrasi dan Kemurnian RNA

Kelompok	Sampel	Konsentrasi (µg/mL)	Kemurnian (A260/A280)
KN	Tikus 1	66.747 µg/mL	1.995
K-	Tikus 1	110.758 µg/mL	1.990
P1 150	Tikus 1	96.159 µg/mL	2.030
	Tikus 2	87.088 µg/mL	1.684
	Tikus 3	122.130 µg/mL	1.808
P2 300	Tikus 1	69.707 µg/mL	1.853
	Tikus 2	92.745 µg/mL	1.997
	Tikus 3	46.735 µg/mL	2.011
P3 450	Tikus 1	90.840 µg/mL	1.716
	Tikus 2	95.973 µg/mL	1.732
	Tikus 3	57.276 µg/mL	2.338

Konsentrasi RNA berkisar antara 46.735 µg/ml (sampel P2 T3) hingga 122.130 µg/mL (sampel P1 T3). Nilai rasio A260/A280 kemurnian bervariasi dari 1.684 hingga 2.338. Idealnya, rasio A260/A280 untuk RNA murni berada pada rentang 1.8-2.0. Sebagian besar nilai sampel berada dalam rentang tersebut,

meskipun beberapa sampel seperti (P1 T2, P3 T1, P3 T2) menunjukkan nilai di bawah 1,8 yang mengindikasikan adanya kontaminasi protein atau fenol (Bustin, 2019). Namun, secara umum kualitas RNA masih dapat diterima untuk dilanjutkan ke tahap sintesis cDNA, terutama setelah dilakukannya normalisasi volume berdasarkan konsentrasi RNA terendah (46,735 µg/mL).

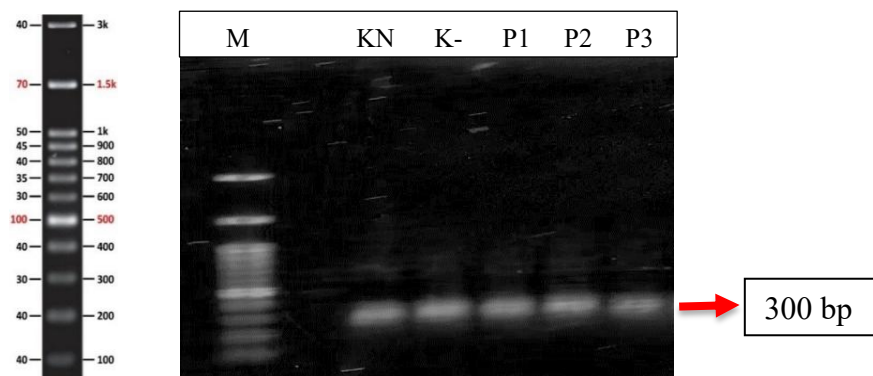
Tabel 4. Hasil Perhitungan Volume RNA

Kelompok	Sampel	Volume RNA
KN	Tikus 1	6,3 µl
K-	Tikus 1	3,7 µl
P1 150	Tikus 1	4,3 µl
	Tikus 2	4,8 µl
	Tikus 3	3,4 µl
P2 300	Tikus 1	6 µl
	Tikus 2	4,5 µl
	Tikus 3	9 µl
P3 450	Tikus 1	4,6 µl
	Tikus 2	4,3 µl
	Tikus 3	7,3 µl

Volume RNA yang digunakan untuk sintesis cDNA bervariasi antara 3,4 µL hingga 9,0 µL. Pendekatan ini memastikan bahwa setiap reaksi dimulai dengan jumlah RNA yang setara, sehingga perbedaan ekspresi gen yang diamati nantinya benar-benar berasal dari efek perlakuan, bukan perbedaan kuantitas RNA awal (Bustin, 2019).

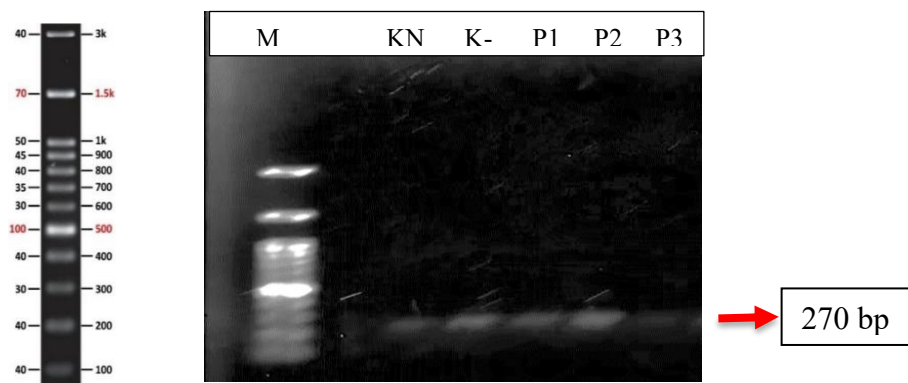
3.3 Ekspresi mRNA IL-6

Hasil PCR dari gen *housekeeping* GAPDH dan gen target IL-6 dielektroforesis pada gel agarosa.



Gambar 1. Elektrofogram PCR Gen *Housekeeping* GAPDH gel divisualisasikan.

Menunjukkan pita GAPDH dengan ukuran sekitar 300 bp (Hu et al., 2020). Intensitas pita GAPDH terlihat konsisten dan jelas di semua kelompok perlakuan (KN, K-, P1, P2, P3), bahkan pada kelompok yang diinduksi etilen glikol sekalipun. Konsistensi ini membuktikan bahwa GAPDH merupakan gen *housekeeping* yang stabil dan tidak terpengaruh oleh kondisi peradangan atau paparan toksin. Hal ini penting karena menunjukkan bahwa proses ekstraksi RNA, sintesis cDNA, dan amplifikasi PCR berjalan dengan baik, sehingga hasil analisis IL-6 dapat diandalkan.



Gambar 2. Elektroforegram PCR IL-6 gel divisualisasikan.

Hasil elektroforesis untuk gen IL-6 menunjukkan pita dengan ukuran sekitar 270 bp. Ukuran pita IL-6 sebesar 270 bp sesuai dengan yang dilaporkan Tiyasatkulkovit et al. (2019) sebagai target umum dalam studi ekspresi sitokin dengan amplifikasi yang efisien. sesuai yang disampaikan (Tiyasatkulkovit et al., 2019), yang menyatakan bahwa pada IL-6 ukuran band berada pada 270 bp merupakan target yang umum dalam studi ekspresi sitokin tikus menunjukkan amplifikasi yang efisien. Pada kelompok kontrol normal (KN), pita IL-6 tampak paling samar, menunjukkan IL-6 adalah sitokin pro-inflamasi yang hanya diproduksi dalam jumlah signifikan saat ada cedera atau infeksi. Sebaliknya, pada kelompok kontrol negatif (K-) yang hanya diberi etilen glikol, pita IL-6 jauh lebih tebal, mengonfirmasi bahwa paparan etilen glikol berhasil memicu respons peradangan yang kuat. Pada kelompok P1 (dosis 150 mg/kg), pita IL-6 tampak lebih redup dibandingkan K-, menunjukkan efek penekanan. Namun, pada kelompok P2 (300 mg/kg) dan P3 (450 mg/kg), ketebalan pita cenderung menyerupai K- atau bahkan lebih tebal pada beberapa sampel, mengindikasikan respons yang tidak

konsisten.

Untuk mengubah observasi visual ini menjadi data yang objektif dan terukur, maka dilakukan analisis densitometrik menggunakan *software ImageJ*. Teknik ini melakukan pengukuran intensitas cahaya setiap pita DNA dalam pixel. Setelah mengurangi pengaruh latar belakang, kemudian didapati nilai intensitas bersih (*net intensity*) dari gen target (IL-6) yang kemudian dinormalisasi terhadap nilai intensitas gen *housekeeping* (GAPDH) pada sampel yang sama. Setelah normalisasi terhadap GAPDH, dihitung *fold change* ekspresi IL-6 relatif terhadap kelompok KN.

Tabel 5. Pengukuran ekspresi mRNA IL-6 dan gen *Housekeeping* GAPDH

Perlakuan	Dosis (mg/KG)	Fold Change (mean)	Fold Change (SD)
KN	-	1	N/A
K-	EG saja	2.34	N/A
P1	150	1.5	0.47
P2	300	1.65	0.58
P3	450	2.08	0.91

Terlihat bahwa induksi etilen glikol meningkatkan ekspresi IL-6 sebesar 2,34 kali lipat dibandingkan kondisi normal. Lonjakan ini cukup drastis dan mengonfirmasi bahwa model neuroinflamasi pada tikus berhasil dibuat. Peningkatan IL-6 ini konsisten dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa stres oksidatif akibat paparan toksin mengaktifkan jalur NF- κ B dan meningkatkan transkripsi gen IL-6 (Saha et al., 2020). Pemberian ekstrak daun kelor dosis 150 mg/kg berhasil menekan ekspresi IL-6 menjadi 1,50 kali lipat, artinya terjadi penurunan sekitar 36% dibandingkan kelompok K-. Namun, pada dosis 300 mg/kg, *fold change* hanya turun menjadi 1,65 penurunan sekitar 29%, dan pada dosis 450 mg/kg, *fold change* mencapai 2,08 hanya turun sekitar 11%. Bahkan, pada kelompok P3, nilai standar deviasinya cukup besar 0,91, menunjukkan variasi antar individu yang tinggi.

Penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak daun kelor memiliki efek anti-inflamasi pada otak tikus yang diinduksi etilen glikol, tetapi efek tersebut tidak bersifat linear tergantung dosis. Dosis 150 mg/kg memberikan efek paling optimal,

sementara dosis yang lebih tinggi justru mengurangi efektivitasnya, bahkan pada dosis 450 mg/kg hampir tidak berbeda dengan kelompok kontrol negatif. Kemampuan ekstrak daun kelor dalam menekan ekspresi IL-6 didukung oleh kandungan flavonoid yang tinggi (34,34 mg/g) dan aktivitas antioksidan yang kuat (IC₅₀ 53,28 µg/mL). Flavonoid seperti quercetin dan kaempferol diketahui memiliki kemampuan untuk melintasi sawar darah-otak dan berinteraksi langsung dengan sel-sel imun di otak, terutama mikroglia (Rodríguez-Gómez et al., 2020). Mikroglia yang teraktivasi oleh stres oksidatif akibat etilen glikol akan melepaskan berbagai sitokin pro-inflamasi termasuk IL-6. Flavonoid dapat menghambat aktivasi mikroglia dengan memblokir jalur pensinyalan (Cheng et al., 2019). Dengan demikian, ekstrak daun kelor tidak hanya berperan sebagai antioksidan dalam menetralkan radikal bebas, tetapi juga memodulasi respon imun pada tingkat transkripsi gen. Pola respons yang menunjukkan penurunan efektivitas pada dosis tinggi ini dikenal sebagai efek *biphasic (hormesis)*. Beberapa senyawa bioaktif, terutama antioksidan, dapat menunjukkan efek yang berbeda pada dosis rendah dan tinggi. Pada dosis rendah, ia bertindak sebagai antioksidan yang melindungi sel, sedangkan pada dosis tinggi, ia dapat berbalik menjadi pro-oksidan yang justru meningkatkan produksi ROS dan memperparah stres oksidatif Satriyani (2021).

4. KESIMPULAN DAN SARAN

4.1 Kesimpulan

Penelitian ini membuktikan bahwa induksi etilen glikol 0,75% selama 30 hari pada tikus Wistar berhasil memicu neuroinflamasi yang ditandai dengan peningkatan ekspresi mRNA IL-6 di jaringan otak hingga 2,34 kali lipat dibandingkan kondisi normal. Pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dosis 150 mg/kg secara signifikan menekan ekspresi IL-6 menjadi 1,50 kali lipat, menunjukkan efek anti-inflamasi yang optimal. Namun, peningkatan dosis menjadi 300 mg/kgBB dan 450 mg/kgBB justru menurunkan efektivitas ekstrak, dengan nilai *fold change* masing-masing 1,65 dan 2,08 kali lipat. Dengan demikian, hasil penelitian ini menyimpulkan bahwa ekstrak daun kelor memiliki potensi sebagai agen neuroprotektif, tetapi efeknya bersifat non-linear dan sangat bergantung pada ketepatan dosis, di mana dosis 150 mg/kgBB merupakan dosis paling efektif dalam

penelitian ini.

4.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, disarankan agar penelitian selanjutnya menggunakan jumlah sampel yang lebih besar untuk meningkatkan validitas dan kekuatan analisis data. Selain itu, perlu dilakukan pengujian dengan variasi dosis yang lebih luas dan interval dosis yang lebih kecil guna memperoleh gambaran hubungan dosis yang lebih akurat.

5. REFERENSI

- BPOM RI. (2023). Seri Buku Saku Penanganan Kasus Cemaran Etilen Glikol dan Dietilen Glikol (EG/DEG) Dalam Sirop Obat Jilid I: Kajian Resiko Etilen Glikol dan Dietilen Glikol (EG/DEG) Dalam Sirop Obat. In *Jakarta Pusat*. Jakarta Pusat (pp. 1–51)
- Bustin, S. A. (2019). Analysis of mRNA Expression by Real-time PCR. *Polymerase Chain Reaction: Theory and Technology, March*. <https://doi.org/10.21775/9781912530243.13>
- Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., & Zhao, L. (2018). Oncotarget 7204. *Oncotarget*, 9(6), 7204–7218. www.impactjournals.com/oncotarget/
- Cheng, S. C., Huang, W. C., Pang, J. H. S., Wu, Y. H., & Cheng, C. Y. (2019). Quercetin inhibits the production of il-1 β -induced inflammatory cytokines and chemokines in arpe-19 cells via the mapk and nf- κ b signaling pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(12). <https://doi.org/10.3390/ijms20122957>
- Fachriyah, E., Kusriani, D., Haryanto, I. B., Wulandari, S. M. B., Lestari, W. I., & Sumariyah, S. (2020). Phytochemical Test, Determination of Total Phenol, Total Flavonoids and Antioxidant Activity of Ethanol Extract of Moringa Leaves (*Moringa oleifera* Lam). *Jurnal Kimia Sains Dan Aplikasi*, 23(8), 290–294. <https://doi.org/10.14710/jksa.23.8.290-294>
- Girsang, E., Lister, I. N. E., Ginting, C. N., Nasution, S. L., Suhartina, S., Munshy, U. Z., Rizal, R., & Widowati, W. (2019). Antioxidant and Anti-Inflammatory activity of Chlorogenic Acid on Lead-Induced Fibroblast Cells. *Journal of Physics: Conference Series*, 1374(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1374/1/012006>
- Hu, Y., Zhang, X., Zhang, J., Li, H., Xia, X., Qiu, C., Liao, Y., Chen, H., Song, Z., & Zhou, W. (2020). STAT3 signaling pathway could be involved in the progress of cognitive dysfunction caused by ligature-induced periodontitis. *Research Square*, 1–33. <https://doi.org/10.21203/rs.2.23488/v1>
- Intishar, I. N. (2023). Pengaruh Perkembangan Otak pada Kemampuan Kognitif dan Perilaku dari Masa Infansi hingga Dewasa: Tinjauan Terkini. *Jurnal Sinestesia*, 13(2), 1216–1223.
- Jiang, S., Shi, D., Bai, L., Niu, T., Kang, R., & Liu, Y. (2023). Inhibition of interleukin-6 trans-signaling improves survival and prevents cognitive impairment in a mouse model of sepsis. *International Immunopharmacology*, 119(March), 110169.

<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.110169>

- Kurniawan, R., & Hanifah, S. (2024). Ethylene Glycol Toxicity and Its Therapy Management: A Literature Review. *Jurnal Manajemen Dan Pelayanan Farmasi (Journal of Management and Pharmacy Practice)*, 14(2), 85. <https://doi.org/10.22146/jmpf.81552>
- Manu, D. R., Slevin, M., Barcutean, L., Forro, T., Boghitoiu, T., & Balasa, R. (2023). Astrocyte Involvement in Blood–Brain Barrier Function: A Critical Update Highlighting Novel, Complex, Neurovascular Interactions. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(24). <https://doi.org/10.3390/ijms242417146>
- Marhaeni, L. S. (2021). DAUN KELOR (*Moringa oleifera*) Sebagai Sumber Panganfungsional Dan Antioksidan. *Jurnal Agrisia, Vol.13(2)*, 40–53.
- Munawaroh, F., Hanif, A. A., & Kemuning, A. R. (2024). Efek Asam Klorogenat pada Ekspresi Mrna IL-6 dan CD86 Lobus Frontal Tikus Model Diabetes Mellitus. 3(4), 154–162.
- Nasir, N., & Chalik, R. (2024). Persepsi Masyarakat Terhadap Etilen Glikol Dan Dietilen Glikol Pada Penggunaan Obat. 2(2), 40–49.
- Ola, A. T. R. (2020). Identifikasi Senyawa yang Terkandung pada Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*). *Indonesian Journal of Fundamental Sciences*, 6(2), 63–70.
- Ramona Sigit Prakoeswa, F., Hidayat, S., Aditya Adhi Satria, Y., & Shabrina Awanis, G. (2022). Faktor-Faktor yang Dapat Memengaruhi Keseimbangan Th17/Treg. *Review Articiel*, 6(1), 106–113. <http://journal.unnes.ac.id/sju/index.php/higeia>
- Rodríguez-Gómez, J. A., Kavanagh, E., Engskog-Vlachos, P., Engskog, M. K. R., Herrera, A. J., Espinosa-Oliva, A. M., Joseph, B., Hajji, N., Venero, J. L., & Burguillos, M. A. (2020). Microglia: Agents of the CNS Pro-Inflammatory Response. *Cells*, 9(7), 1–46. <https://doi.org/10.3390/cells9071717>
- Saha, S., Buttari, B., Panieri, E., Profumo, E., & Saso, L. (2020). An Overview of Nrf2 Signaling Pathway and Its Role in Inflammation. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(22), 1–31. <https://doi.org/10.3390/molecules25225474>
- Satriyani, D. P. P. (2021). Review artikel: Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lam.). *Jurnal Farmasi Malahayati*, 4(1), 31–43. <https://doi.org/10.33024/jfm.v4i1.4263>
- Simorangkir, L. T., & Suharjo, S. (2023). Peran Fomepizole dalam Penanganan Toksisitas Etilen Glikol dan Dietilen Glikol. *Journal of Islamic Pharmacy*, 8(1), 39–43. <https://doi.org/10.18860/jip.v8i1.20790>
- Tiyasatkulkovit, W., Promruk, W., & Rojviriya, C. (2019). Impairment of bone microstructure and upregulation of osteoclastogenic markers in spontaneously hypertensive rats. *August*, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48797-8>