

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN *Moringa oleifera*
TERHADAP PENURUNAN KADAR ALANIN AMINOTRANSFERASE
(ALT) DAN ASPARTAT AMINOTRANSFERASE (AST) SERUM TIKUS
MODEL FIBROSIS HATI AKIBAT INJEKSI KRONIS KARBON
TETRAKLORIDA (CCl₄)**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



Oleh:

Ruth Clarita Pradibdo

NIM: 165070100111012

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2019

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN *Moringa oleifera* TERHADAP
PENURUNAN KADAR ALANIN AMINOTRANSFERASE (ALT) DAN
ASPARTAT AMINOTRANSFERASE (AST) SERUM TIKUS MODEL FIBROSIS
HATI AKIBAT INJEKSI KRONIS KARBON TETRAKLORIDA (CCl₄)**

Oleh :

Ruth Clarita Pradibdo
NIM. 165070100111012

Telah diuji pada
Hari : Jumat
Tanggal : 6 Desember 2019

Dan dinyatakan lulus oleh :
Penguji I

dr. Desy Wulandari, Sp.A., M.Biomed
NIP. 2016078410212001

Pembimbing I/Penguji II

Pembimbing II/Penguji III

dr. Supriono, Sp.PD-KGEH
NIP. 19660517 199803 1 004

Dr. dr. Aswoco Andyk Asmoro, Sp.An., FIPM
NIP. 19630810 119803 1 002

Mengetahui,
Ketua Program Studi Pendidikan Dokter,

dr. Triwahju Astuti, M.Kes, Sp.P(K)
NIP. 196310221996012001

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ruth Clarita Pradibdo

NIM : 165070100111012

Program Studi : Sarjana Kedokteran

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini adalah hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil plagiat, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 5 Desember 2019

Yang membuat pernyataan,

Ruth Clarita Pradibdo

NIM. 165070100111012

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur bagi Tuhan Yesus Kristus yang hanya oleh kasih karuniaNya, penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir dengan judul **PENGARUH**

PEMBERIAN EKSTRAK DAUN *Moringa oleifera* TERHADAP PENURUNAN

KADAR ALANIN AMINOTRANSFERASE (ALT) DAN ASPARTAT

AMINOTRANSFERASE (AST) SERUM TIKUS MODEL FIBROSIS HATI AKIBAT

INJEKSI KRONIS KARBON TETRAKLORIDA (CCl₄). Dalam hal ini, penulis

hendak bersyukur lagi kepada Tuhan Yesus atas kehadiran orang-orang yang luar biasa di bawah ini

1. **dr. Supriono, Sp.PD-KGEH** selaku Dosen Pembimbing pertama yang dengan baik hati mengizinkan penulis mengikuti penelitian pohon, meluangkan waktu untuk membimbing penulisan, dan memberi saran untuk perbaikan tugas akhir ini.
2. **Dr. dr. Aswoco Andyk Asmoro, Sp.An, FIPM**, selaku Dosen Pembimbing kedua yang dengan sepenuh hati membagikan ilmu, waktu, dan perhatian bagi penulis hingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir ini.
3. **dr. Desy Wulandari, Sp.A., M.Biomed**, selaku penguji pertama yang telah memberikan arahan dalam perbaikan tugas akhir ini.
4. **dr. Triwahju Astuti, M.Kes, Sp.P(K)**, selaku Ketua Program Studi Sarjana Kedokteran Universitas Brawijaya.
5. **Dr. dr. Wisnu Barlianto, Msi.Med, Sp.A(K)**, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

6. Papa **Ponang Pradibdo**, Mama **Lely Harakai**, Oma **Rambu Ngana Kalaway**, Sara, dan **Debora** atas doa-doa yang tidak pernah putus dan

cinta yang selalu menerima apa adanya.

7. **Bapak Gunawan**, **Mama Atik**, **Bapak Chris**, **Mama Tutik**, **Bu Desi**, **Pak Suar**, yang setia mendukung dan mendoakan selama penulis ada di Malang.

8. **PMK**, **Lakesma**, **LPM**, **Medical's Choir**, **Club Volly** yang ikut menjadi saksi perkembangan penulis di Fakultas kedokteran Universitas Brawijaya.

9. Teman-teman seperjuangan saya, kelas **PD-A 2016** yang senantiasa mengisi hari-hari perkuliahan di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

10. Sahabat-sahabat penulis, saudara dalam berbagai keadaan dan tempat di mana penulis dapat menjadi diri sendiri. **Abang Arif**, **Dongdong**, **Emak Yoen**, **Sherly**, **Ade**, **Ay**, **Olip**, **Dinda**, **Shanine**.

11. Dan semua pihak yang telah membantu menyelesaikan tugas akhir ini yang tidak bisa disebutkan satu persatu.

Akhir kata, biarlah semuanya kembali untuk kemuliaan Bapa.

Malang, 7 Oktober 2019

Penulis

ABSTRAK

Pradibdo, Ruth Clarita. 2019. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun *Moringa oleifera* terhadap Penurunan Kadar Alanin Aminotransferase (ALT) dan Aspartat Aminotransferase (AST) Serum Tikus Model Fibrosis Hati akibat Injeksi Kronis Karbon Tetraklorida (CCl₄). Tugas Akhir, Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) dr. Supriono, Sp.PD-KGEH (2) Dr. dr. Aswoco Andyk Asmoro, Sp.An, FIPM.

Secara global, penyakit hati kronis merupakan masalah kesehatan yang cukup banyak ditemui sehingga sangat penting dilakukan penelitian-penelitian terkait usaha penatalaksanaannya. Alanin aminotransferase (ALT) dan aspartat aminotransferase (AST) merupakan enzim yang dapat meningkat dalam plasma akibat injuri sel hepar (hepatosit). Diketahui bahwa senyawa seperti karbon tetraklorida (CCl₄) dapat memicu injuri hepatosit melalui pembentukan radikal bebas. Radikal bebas sendiri dapat dieliminasi dengan antioksidan. Daun *Moringa oleifera* mengandung antioksidan yang bersifat hepatoprotektif dengan menangkal radikal bebas dan injuri hepatosit. Penelitian dengan metode *randomized posttest only controlled group design* ini bertujuan mengetahui pengaruh pemberian *Moringa oleifera* (MO) terhadap ALT dan AST serum tikus model yang diberikan injeksi kronis CCl₄. Penelitian menggunakan 5 kelompok tikus berbeda. Kadar ALT dan AST serum diperiksa dengan metode Optimized UV-test berdasarkan metode modifikasi IFCC (*International Federation of Clinical Chemistry*) tanpa *pyridoxal phosphate*. Hasil uji *Mann Whitney U* menunjukkan pemberian MO menghasilkan kadar ALT yang lebih rendah, tidak signifikan pada dosis 150 mg/kgBB ($p=0.917$) dan signifikan pada dosis 600 mg/kgBB ($p=0.009$), dibandingkan kelompok tanpa pemberian MO. Sedangkan AST ditemukan tidak terpengaruh secara signifikan dengan pemberian MO, baik dosis 150 mg/kgBB ($p=0.076$) maupun dosis 600 mg/kgBB ($p=0.117$). Dapat disimpulkan bahwa pemberian MO berpengaruh terhadap penurunan kadar ALT serum dan tidak berpengaruh terhadap kadar AST serum tikus model fibrosis hati akibat injeksi kronis CCl₄.

Kata Kunci : *Moringa oleifera*, ALT, AST, CCl₄.

ABSTRACT

Pradibdo, Ruth Clarita. 2019. Effect of *Moringa Oleifera* Leaf Extract on Decreased Levels of Alanine Aminotransferase (ALT) and Aspartate Aminotransferase (AST) Serum Mouse model Liver Fibrosis due to Chronic Carbon Tetrachloride (CCl₄) Injection. Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine Brawijaya University. Pembimbing : (1) dr. Supriono, Sp.PD-KGEH (2) Dr. dr. Aswoco Andyk Asmoro, Sp.An, FIPM.

Globally, chronic liver disease is a fairly common health problem that is very important to do research related to its management efforts. Alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) are enzymes that can be increased in plasma due to liver cell (hepatocytes) injury. It is known that compounds such as carbon tetrachloride (CCl₄) can trigger hepatocyte injury through the formation of free radicals. Free radicals themselves can be eliminated by antioxidants. *Moringa oleifera* leaves contain antioxidants that are hepatoprotective by counteracting free radicals and injury to hepatocytes. This study using randomized posttest only controlled group design aims to determine the effect of *Moringa oleifera* (MO) administration on ALT and AST serum in rats with CCl₄-induced liver fibrosis. The study used 5 different groups of mice. Serum ALT and AST levels were examined by the Optimized UV-test method based on the IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) modification method without pyridoxal phosphate. The Mann Whitney U test results showed that the administration of MO resulted in lower ALT levels, not significantly at a dose of 150 mg / kgBB ($p = 0.917$) and significant at a dose of 600 mg / kgBB ($p = 0.009$), compared to the group without MO administration. Whereas AST was found not significantly affected by the administration of MO, both a dose of 150 mg / kgBB ($p = 0.076$) and a dose of 600 mg / kgBB ($p = 0.117$). It can be concluded that the administration of MO affects the decrease in serum ALT levels and does not affect the serum AST levels of rat liver fibrosis models due to chronic CCl₄ injection.

Keywords : *Moringa oleifera*, ALT, AST, CCl₄.



DAFTAR ISI

HALAMAN

JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
ABSTRAK.....	vi
ABSTRACT.....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
DAFTAR SINGKATAN.....	xiv

BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1 Tujuan Umum.....	3
1.3.2 Tujuan Khusus.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
1.4.1 Manfaat Akademik.....	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Karbon Tetraklorida.....	5
2.1.1 Karbon Tetraklorida: Stres Oksidatif dan Kematian Sel.....	5
2.1.2 Apoptosis Hepatosit menyebabkan Fibrosis pada Injuri Kronis.....	8
2.1.3 Penggunaan Karbon Tetraklorida dalam Penelitian Fibrosis Hati.....	9
2.2 Alanin Aminotransferase (ALT) dan Aspartat Aminotransferase (AST).....	9
2.2.1 ALT dan AST pada Hati.....	9
2.2.2 Pengaruh Injuri Hati akibat Injeksi CCl ₄ Terhadap Kadar ALT dan AST Serum.....	12
2.3 <i>Moringa oleifera</i>	14

2.3.1 Morfologi dan Taksonomi <i>Moringa oleifera</i>	14
2.3.2 Daun <i>Moringa oleifera</i> : Kandungan dan Aktivitas Antioksidan.....	16
2.3.3 <i>Moringa oleifera</i> : Pengaruh terhadap ALT & AST.....	21
2.3.4 <i>Moringa oleifera</i> : Perhatian Khusus.....	22
BAB 3 KERANGKA DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....	23
3.1 Kerangka Konsep Penelitian.....	23
3.2 Hipotesis Penelitian.....	26
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	27
4.1 Rancangan Penelitian.....	27
4.2 Populasi dan Sampel.....	28
4.2.1 Estimasi Jumlah Sampel.....	29
4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	30
4.4 Variabel Penelitian.....	30
4.4.1 Variabel Bebas.....	30
4.4.2 Variabel Terikat.....	30
4.5 Definisi Operasional.....	30
4.6 Bahan dan Alat Penelitian.....	32
4.6.1 Alat dan Bahan untuk Pengeringan, Ekstraksi, dan Evaporasi daun <i>Moringa oleifera</i> (MO)	32
4.6.2 Alat dan Bahan untuk Pemeliharaan Tikus	32
4.6.3 Alat dan Bahan untuk Pembuatan dan Penyimpanan Larutan Karbon Tetraklorida (CCl ₄)	33
4.6.4 Alat dan Bahan untuk Penyimpanan Larutan Natrium Klorida (NaCl)	33
4.6.5 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Larutan <i>Moringa oleifera</i> (MO)	33
4.6.6 Alat dan Bahan untuk Injeksi Karbon Tetraklorida (CCl ₄) dan Natrium Klorida (NaCl).....	34
4.6.7 Alat dan Bahan untuk Sonde <i>Moringa oleifera</i> (MO) dan Aquades.....	34
4.6.8 Alat dan Bahan untuk Pembedahan Tikus & Pengambilan Sampel Darah	34
4.7.9 Alat dan Bahan untuk Pemisahan Serum dari Darah.....	35
4.7.10 Alat dan Bahan untuk Pemeriksaan Kadar ALT & AST Serum ..	35

4.7 Prosedur Penelitian	36
4.7.1 Pengeringan, Ekstraksi, dan Evaporasi daun <i>Moringa oleifera</i> (MO)	36
4.7.2 Pemeliharaan Tikus (Kandang & Makanan)	36
4.7.3 Pembuatan Larutan Karbon Tetraklorida (CCl ₄)	38
4.7.4 Pembuatan Larutan Natrium Klorida (NaCl)	39
4.7.5 Pembuatan Larutan <i>Moringa oleifera</i> (MO)	39
4.7.6 Injeksi Karbon Tetraklorida (CCl ₄) dan Natrium Klorida (NaCl)	40
4.7.7 Sonde <i>Moringa oleifera</i> (MO) dan Aquades	41
4.7.8 Pembedahan Tikus & Pengambilan Sampel Darah	41
4.7.9 Pemisahan Serum dari Darah	42
4.7.10 Pemeriksaan Kadar ALT & AST Serum	43
4.8 Pengolahan Data	43
4.8.1 Uji Analisis	43
4.8.2 Penulisan dan Pelaporan Hasil Penelitian	44
4.9 Alur Penelitian	45
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	46
5.1 Hasil Penelitian	46
5.2 Analisis Data	49
5.2.1 Uji Asumsi Data	49
5.2.2 Uji Kruskal Wallis	51
5.2.3 Uji Mann Whitney U	51
BAB 6 PEMBAHASAN	52
6.1 Pembahasan Hasil Penelitian	52
6.2 Keterbatasan Penelitian	55
BAB 7 PENUTUP	56
7.1 Kesimpulan	56
7.2 Saran	56
DAFTAR PUSTAKA	57
LAMPIRAN	63

DAFTAR TABEL

HALAMAN

Tabel 5.1 Hasil ALT dari 5 Kelompok Perlakuan	46
Tabel 5.2 Hasil AST dari 5 Kelompok Perlakuan	48
Tabel 5.3 Hasil Uji Normalitas ALT dan AST	50
Tabel 5.4 Hasil Uji Homogenitas ALT dan AST	50
Tabel 5.5 Hasil Uji <i>Kruskal Wallis</i> ALT dan AST	51
Tabel 5.6 Hasil Uji <i>Mann Whitney U</i> ALT dan AST	51



DAFTAR GAMBAR

HALAMAN

Gambar 2.1 Lokasi AST dan ALT dalam hepatosit.....	11
Gambar 2.2 Konsentrasi ALT dan AST berdasarkan lokasi hepatosit pada triad portal.....	11
Gambar 2.3 Daun dan pohon <i>Moringa oleifera</i>	15
Gambar 5.1 Grafik rata-rata kadar ALT setiap kelompok perlakuan.....	46
Gambar 5.2 Grafik rata-rata kadar AST setiap kelompok perlakuan.....	48



DAFTAR LAMPIRAN

HALAMAN

Lampiran 1. Pelaksanaan Penelitian	63
Lampiran 2. Uji Normalitas dan Uji Homogenitas	64
Lampiran 3. Uji <i>Kruskal Wallis</i>	66
Lampiran 4. Uji <i>Mann Whitney U</i>	66
Lampiran 5. Keterangan Kelaikan Etik	69



DAFTAR SINGKATAN

4-HNE	: 4-Hidroksinenal
ALT	: Alanin Aminotransferase
AST	: Aspartat Aminotransferase
CAT	: <i>Catalase</i> / Katalase
CCl ₄	: Karbon tetraklorida
CLD	: <i>Chronic Liver Disease</i>
CTGF	: <i>Connective Tissue Growth Factor</i>
EGF	: <i>Epidermal Growth Factor</i>
GPX	: Glutathion Peroksidase
GR	: Glutathion Reduktase
GSH	: Glutathion
gTAE/kg	: <i>gram equivalent Tanic acid for 1 kilogram</i>
HSC	: <i>Hepatic Stellate Cell</i> / Sel Stelata Hepatik
IFCC	: International Federation of Clinical Chemistry
IGF	: <i>Insulin-Like Growth Factor</i>
IP	: Intraperitoneal
KNeg	: kelompok Kontrol Negatif
KP1	: Kelompok Perlakuan 1
KP2	: Kelompok Perlakuan 2
KP3	: Kelompok Perlakuan
KPos	: Kelompok Kontrol Positif
mgGAE/kg	: <i>milligram equivalent Gallic acid for 1 kilogram</i>
mgRE/g	: <i>milligram equivalent Rutin for 1 gram</i>
mgTAE/kg	: <i>milligram equivalent Tanic acid for 1 kilogram</i>

MO : *Moringa oleifera*

PDGF : *Platelet-Derived Growth Factor*

PUFAs : *Poliunsaturated Fatty Acid / asam lemak poliunsaturasi*

ROS : *Reactive Oxygen Species*

SOD : *Superoxida Dismutase*

SPSS : *Statistical Product of Service Solution*

TGF : *Transforming Growth Factor*

TNF : *Tumor Necrosis Factor*

WHO : *World Health Organization*





BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Secara global, penyakit hati kronis merupakan masalah kesehatan yang cukup banyak ditemui sehingga sangat penting dilakukan penelitian-penelitian terkait usaha pencegahan maupun penatalaksanaannya. Pada tahun 2014, 844 juta penduduk dunia mengalami penyakit hati kronis (*Chronic Liver Disease*, CLD), dengan tingkat mortalitas 2 juta orang per tahun. Angka ini dapat dibandingkan dengan penyakit kronis lain yang jumlahnya tidak sedikit dalam masyarakat seperti diabetes (422 juta, mortalitas 1.6 juta), penyakit paru-paru (650 juta, mortalitas 6.17 juta), penyakit kardiovaskuler (540 juta, mortalitas 17.7 juta) (Byass, 2014).

Salah satu bahan yang dapat memicu injuri hepatosit adalah karbon tetraklorida (CCl_4). CCl_4 merupakan bahan halometana yang memicu terbentuknya radikal bebas yaitu radikal triklorometil, yang dengan oksigen akan membentuk radikal triklorometilperoksi, menyebabkan keadaan stres oksidatif akibat ketidakseimbangan antara *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan antioksidan yang tersedia di dalam sel (Li *et al.*, 2015). Metabolit CCl_4 bereaksi dengan asam lemak poliunsaturasi untuk memperbanyak reaksi rantai peroksidasi lipid atau secara kovalen berikatan dengan lemak dan protein, berakhir pada destruksi membran hepatosit dan injuri hati yang mengarah pada fibrosis hati (Khan & Sultana, 2009).

Pada hepatosit terdapat enzim yang berperan sebagai katalisator dalam berbagai proses metabolismenya, antara lain adalah alanin aminotransferase (ALT) dan aspartat aminotransferase (AST). Konsentrasi ALT terbanyak terdapat di hepatosit (sitoplasma) dan sangat rendah pada jaringan yang lain, sedangkan AST

selain terdapat pada hepatosit (sitoplasma dan mitokondria) juga terdapat dalam jaringan lain seperti otot, ginjal, dan otak (Franklin *et al.*, 2012). Karenanya, kenaikan kadar ALT dalam serum secara lebih spesifik mengarah pada kerusakan hepatosit dibandingkan AST. Berkaitan dengan destruksi membran hepatosit dan injuri hati, kadar ALT dan AST serum akan mengalami peningkatan karena lokasinya pada sitoplasma dan pelepasannya ke sirkulasi (Ahsan *et al.*, 2009).

Secara alami terdapat bahan-bahan yang bersifat hepatoprotektif, salah satunya adalah *Moringa oleifera*. *Moringa oleifera* merupakan tumbuhan yang umumnya terdapat di negara-negara beriklim tropis dan subtropis (Nouman *et al.*, 2014). Semua bagian dari pohon *Moringa oleifera* digunakan secara tradisional untuk banyak tujuan, terutama daunnya (Popola & Obembe, 2013). Secara khusus, dimanfaatkan sebagai sumber nutrisi dan obat-obatan (Leone *et al.*, 2015). Daun *Moringa oleifera* dilaporkan memiliki kandungan vitamin A yang lebih banyak dari wortel, kalsium lebih banyak dari susu, zat besi lebih banyak dari bayam, vitamin C lebih banyak dari jeruk, dan potasium lebih banyak dari pisang (Gopalakrishnan *et al.*, 2016).

Berkaitan dengan stres oksidatif akibat injeksi CCl₄, *Moringa oleifera* mengandung asam klorogenat, asam galat, dan kuersetin (Verma *et al.*, 2009) dan bersama fitokemikal lain berperan sebagai antioksidan. Penangkapan radikal-radikal bebas merupakan mekanisme kerja utama antioksidan untuk menghambat reaksi rantai peroksidasi lipid. Selain digunakan sebagai bahan sumber antioksidan, daun *Moringa oleifera* memiliki keunggulan dibandingkan dengan sumber antioksidan alami lain karena dapat juga digunakan untuk mengobati asma, hiperglikemia, dislipidemia, flu, sifilis, malaria, pneumonia, diare, sakit kepala, penyakit kulit, bronkitis, infeksi mata dan telinga. Juga mengurangi, tekanan darah

dan kolesterol serta bertindak sebagai antikanker, antimikroba, antidiabetic, agen anti-aterosklerotik, dan neuroprotektan (Gopalakrishnan *et al.*, 2016).

Pemberian ekstrak daun *Moringa oleifera* pada tikus yang diinjeksi CCl_4 diharapkan dapat menghambat proses kerusakan hepatosit melalui efek antioksidan karena menghambat keadaan stres oksidatif. Efek pemberian ekstrak daun *Moringa oleifera* dapat dilihat melalui kadar ALT dan AST serum yang lebih rendah karena kerusakan membran sel yang dihambat. Diharapkan dengan adanya penelitian ini, masyarakat dapat meningkatkan pemanfaatan sifat hepatoprotektif dari ekstrak daun *Moringa oleifera*.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah pemberian ekstrak daun *Moringa oleifera* dapat berpengaruh terhadap penurunan kadar alanin aminotransferase (ALT) tikus model fibrosis hati akibat injeksi kronis karbon tetraklorida (CCl_4)?
2. Apakah pemberian ekstrak daun *Moringa oleifera* dapat berpengaruh terhadap penurunan kadar aspartat aminotransferase (AST) tikus model fibrosis hati akibat injeksi kronis karbon tetraklorida (CCl_4)?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun *Moringa oleifera* terhadap penurunan kadar ALT dan AST tikus model fibrosis hati akibat injeksi kronis karbon tetraklorida (CCl_4).

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengukur kadar ALT serum pada tikus model fibrosis hati akibat injeksi kronis karbon tetraklorida (CCl_4) yang diberikan ekstrak daun *Moringa oleifera*.
2. Mengukur kadar AST serum pada tikus model fibrosis hati akibat injeksi kronis karbon tetraklorida (CCl_4) yang diberikan ekstrak daun *Moringa oleifera*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

Dapat dijadikan sebagai rujukan dalam upaya pengembangan Ilmu Farmakologi fakultas kedokteran Universitas Brawijaya tentang pengaruh pemberian ekstrak daun *Moringa oleifera* terhadap penurunan kadar alanin aminotransferase (ALT) dan aspartat aminotransferase (AST) serum pada tikus model fibrosis hati akibat injeksi kronis karbon tetraklorida (CCl_4).

1.4.2 Manfaat Praktis

Dapat dijadikan sebagai rujukan bagi masyarakat dalam meningkatkan penggunaan daun *Moringa oleifera* sebagai bahan obat-obatan alami yang murah dan mudah didapatkan, yang juga dapat ditambahkan pada pengobatan yang sudah ada pada beberapa penyakit sesuai dengan kandungan aktifnya.

BAB 2**TINJAUAN PUSTAKA****2.1 Karbon Tetraklorida****2.1.1 Karbon Tetraklorida: Stres Oksidatif dan Kematian Sel**

Karbon tetraklorida (CCl_4) dimediasi oleh sitokrom P450 untuk membentuk radikal bebas triklorometil, CCl_3 , dan dengan oksigen membentuk radikal bebas triklorometilperoksi, CCl_3OO (Yanguas *et al.*, 2016). Radikal bebas ini dapat terikat dengan molekul-molekul seluler (asam nukleat, protein, dan lipid) dan merusak proses seluler penting seperti metabolisme lipid, menghasilkan degenerasi lemak. Terjadi proses inisiasi reaksi rantai peroksidasi lipid yang merusak asam lemak poliunsaturasi (PUFAs) dan menyebabkan injuri hepatosit (Sreelatha & Padma, 2010). Pemberian CCl_4 menyebabkan kerusakan oksidatif yang ditunjukkan melalui peningkatan kebocoran laktat dehidrogenase (LDH), kadar malondaldehid (MDA) hepatic, dan penurunan signifikan dari konsentrasi glutathion (GSH), katalase (CAT), superoksida dismutase (SOD), glutathion peroksidase (GPX), dan aktivitas glutathion reduktase (GR) (Sreelatha & Padma, 2010).

Peroksidasi lipid secara umum merupakan proses dimana oksidan seperti radikal bebas maupun spesies nonradikal merusak lipid yang mengandung karbon ikatan rangkap, khususnya asam lemak poliunsaturasi (PUFAs) yang melibatkan abstraksi hidrogen dari karbon, dengan sisipan oksigen menghasilkan radikal lipid peroksil dan hidroperoksida. Glikolipid, fosfolipid, dan kolesterol juga merupakan target untuk dirusak dan dimodifikasi secara peroksidatif. Lipid dapat dioksidasi oleh enzim-enzim seperti sitokrom P450, lipooksigenase, dan siklooksigenase. Sebagai respon terhadap peroksidasi membran lipid, dan sesuai dengan keadaan

metabolik tertentu dan kemampuan perbaikan, sel dapat meningkatkan kelangsungan hidupnya atau mengalami kematian sel. Secara fisiologis maupun dengan tingkat peroksidasi lipid yang rendah (keadaan subtoksik), sel menstimulasi keselamatannya melalui sistem pertahanan antioksidan konstitutif atau aktivasi jalur sinyal yang meningkatkan regulasi protein antioksidan dan menghasilkan respon stres adaptif. Sebaliknya, tingkat peroksidasi lipid medium dan tinggi (kondisi toksik) menyebabkan kerusakan oksidatif melampaui kemampuan perbaikan, sehingga sel menginduksi kematian sel melalui apoptosis dan nekrosis. Apoptosis dan nekrosis menyebabkan kerusakan sel secara molekuler yang mana dapat memfasilitasi beragam kondisi patologis (Yin *et al.*, 2011).

Salah satu produk akhir dari peroksidasi lipid adalah 4- hidroksinenal (4-HNE). 4-HNE merupakan senyawa elektrofilik tak jenuh α & β , merupakan produk akhir mayor dari 4-hidroksialkenal, terbentuk dari dekomposisi asam arakhidonat dan PUFAs melalui proses enzimatik maupun nonenzimatik. Selain memiliki fungsi fisiologis dan protektif melalui stimulasi ekspresi genetik juga bersifat sitotoksik karena menghambat ekspresi genetik dan memicu progresi dari keadaan patologis. Ekspresi dari dua sifat yang berlawanan ini bergantung pada tipe sel dan keadaan metaboliknya, meningkatkan kelangsungan hidup sel atau kematian (Ayala *et al.*, 2014).

Apoptosis merupakan proses kematian sel terprogram, dan disregulasinya menghasilkan kematian sel yang berkontribusi pada karsinogenesis dan patogenesis berbagai penyakit. Alternatif dari apoptosis adalah nekrosis (kematian sel tidak terprogram), yang diketahui sebagai proses toksik dimana sel merupakan korban pasif. 4-HNE dapat mengaktifkan persinyalan proliferaatif untuk pembelahan

sel dan meningkatkan kelangsungan hidup sel atau “menghentikan” pembelahan sel, dan setelah sekian lama akan mengalami apoptosis. 4-HNE menginduksi proses ini melalui modulasi beberapa faktor transkripsi yang berhubungan dengan stres seperti Nrf2, AP-1, NF- κ B, dan PPAR atau dengan modulasi beberapa jalur persinyalan, termasuk MAPK (p38, Erk, dan JNK), protein kinase B, protein kinase C isoform, regulator siklus sel, reseptor tirosin kinase, dan kaspase. Apoptosis dan nekrosis yang terjadi bergantung pada konsentrasi 4-HNE (Ayala *et al.*, 2014).

4-HNE menginduksi apoptosis melalui reseptor kematian Fas (CD95) yang dimediasi jalur ekstrinsik serta melalui jalur intrinsik p53-dependen. Mekanisme kematian sel oleh 4-HNE dapat dijelaskan sebagai berikut (Ayala *et al.*, 2014): (i) 4-HNE dapat berdifusi dan berinteraksi dengan Fas (CD95/Apo1) pada membran plasma dan mengaktifasi ekspresinya untuk memediasi sinyal apoptosis melalui aktivasi kinase hilir (regulator sinyal apoptosis kinase 1 atau ASK1 dan JNK), yang menyebabkan aktivasi dari eksekusiner kaspase-3 dan berakhir pada apoptosis; (ii) 4-HNE berinteraksi dengan sitoplasmik p53 yang menyebabkan induksi, fosforilasi, dan translokasi nuklear. Di dalam nukleus, p53 menghambat transkripsi gen antiapoptotik (Bcl2) dan memicu transkripsi dari gen proapoptotik (Bax) atau gen siklus sel (p21) yang mengarah pada aktivasi eksekusiner kaspase-3 dan berakhir pada apoptosis.

2.1.2 Apoptosis Hepatosit menyebabkan Fibrosis pada Injuri Kronis

Fibrosis hati merupakan keadaan yang banyak disebabkan oleh penyakit hati kronis, yang dipicu oleh injuri hati kronik dan berkembang melalui rangkaian proses diantaranya apoptosis atau nekrosis, inflamasi, dan proses perbaikan jaringan. Sel stelata hepatik (HSC) merupakan sel kunci fibrogenik yang aktivasinya dominan terjadi pada fibrogenesis. Aktivasi dari HSC mengarah pada perubahan dari *quiescent*, sel yang mengandung banyak vitamin A menjadi miofibroblas proliferatif, fibrogenik, dan kontraktil yang dapat mensintesis dan mensekresikan kolagen, khususnya tipe I & III (Liu *et al.*, 2012). Aktivasi dari HSC merupakan respon terprogram dari injuri hati dan dapat dihasilkan dari injeksi kronis CCl₄ (Liu *et al.*, 2012).

Perubahan awal dari HSC merefleksikan stimulasi parakrin dari sel Kupffer, hepatosit, dan leukosit, sementara sitokin autokrin (termasuk *transforming growth factor* β (TGF- β) dan *connective tissue growth factor* (CTGF)) berperan penting dalam regulasi dan mempertahankan aktivasi HSC. Hepatosit yang rusak melepaskan sitokin (TGF- β , *tumor necrosis factor* α (TNF- α), *epidermal growth factor* (EGF) dan *insulin-like growth factor* (IGF)) yang bertanggungjawab dalam aktivasi sel Kupffer, sel T, dan hepatosit yang rusak juga melepaskan sitokin inflamasi (TNF- α , interferon γ (INF- γ), IL-6), radikal bebas, dan faktor pertumbuhan (*platelet-derived growth factor* (PDGF), CTGF) yang menyebabkan aktivasi HSC dan proliferasinya (Liu *et al.*, 2012).

2.1.3 Penggunaan Karbon Tetraklorida dalam Penelitian Fibrosis Hati

Karbon tetraklorida (CCl_4) merupakan hepatotoksin yang paling banyak digunakan dalam penelitian mengenai fibrosis hati dan sirosis pada tikus. Dalam banyak aspek, perlakuan ini menyerupai penyakit kronis pada manusia akibat bahan toksik. CCl_4 biasanya diinjeksikan intraperitoneal 2-3 kali per minggu selama 4-6 minggu dalam rentang dosis 300–1000 $\mu\text{l/kg}$. CCl_4 juga dapat diberikan secara oral, subkutan atau inhalasi 2 kali seminggu selama 10 minggu. Banyak pendapat mengenai pemberian CCl_4 secara oral. Beberapa peneliti mengatakan bahwa fibrosis hati akan dicapai dengan lebih baik, sedangkan peneliti lain tidak merekomendasikannya karena memiliki risiko tinggi kematian hewan coba (Scholten *et al.*, 2015). Injeksi subkutan menunjukkan penurunan kematian tikus, namun terdapat pertumbuhan granuloma pada lokasi injeksi (Domenicali *et al.*, 2009). Secara inhalasi, pemberian CCl_4 membutuhkan peralatan khusus dan keahlian khusus dari peneliti (Tsujimura *et al.*, 2008).

2.2 Alanin Aminotransferase (ALT) dan Aspartat Aminotransferase (AST)

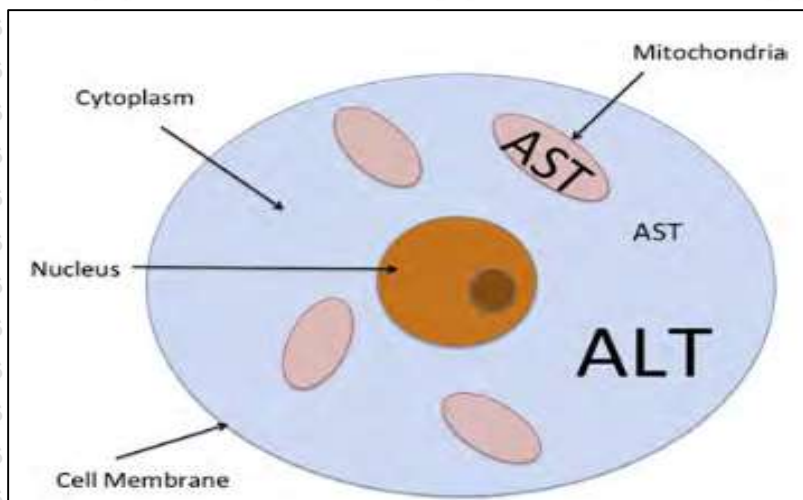
2.2.1 ALT dan AST pada Hati

Hati mengandung banyak enzim dalam konsentrasi yang tinggi, beberapa dari enzim-enzim tersebut juga terdapat dalam serum dengan konsentrasi yang sangat rendah. Injuri dari membran hepatosit menyebabkan pelepasan enzim-enzim ini ke dalam serum, sehingga terjadi peningkatan konsentrasi enzim di dalam serum dalam beberapa jam setelah injuri hati. Tes kandungan enzim serum dikategorikan dalam 2 kelompok (Franklin Herlong & Mitchell, 2012): enzim yang peningkatannya menunjukkan kerusakan general dari hepatosit (aminotransferase); dan enzim yang peningkatannya secara primer menunjukkan kolestasis (AP, γ glutamyltransferase [GGT], 5' nucleotidase [5'-NT]).

Enzim aminotransferase (sebelumnya disebut transaminase) terletak di hepatosit dan menjadi indikator yang sensitif pada injuri hepatosit.

Aminotransferase terdiri atas alanin aminotransferase (ALT) dan aspartat aminotransferase (AST). Aminotransferase mengkatalis transfer dari kelompok a-amino dari aspartat atau alanin ke kelompok a-keto dari asam ketoglutarat, membentuk asam oksaloasetat dan asam piruvat. Reduksi enzimatis dari asam oksaloasetat dan asam piruvat masing-masing menjadi malat dan laktat (Mukherjee & Gollan, 2011).

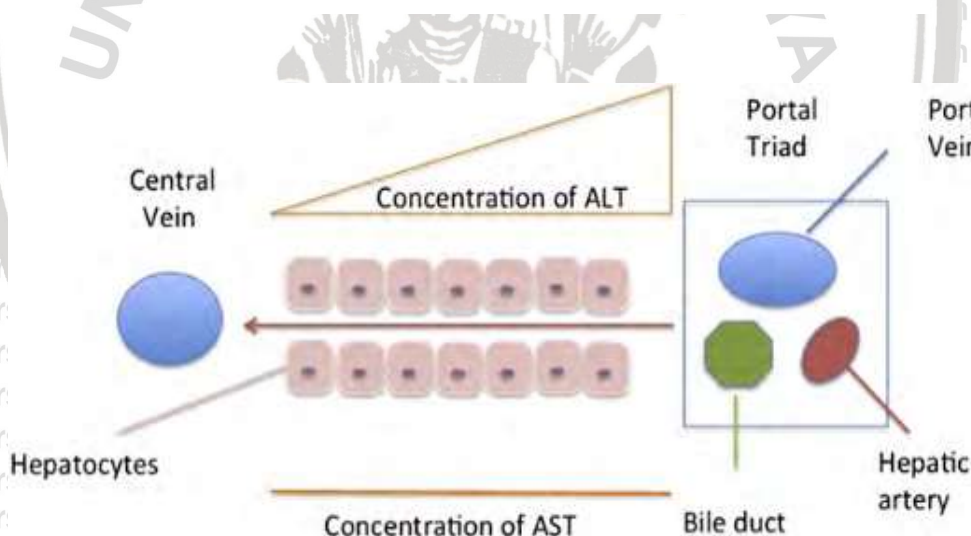
ALT dan AST terdapat di dalam serum dengan konsentrasi yang rendah, biasanya kurang dari 30-40 IU/L. Namun, rentang normal dapat bervariasi pada laboratorium karena berasal dari pengukuran pada populasi tertentu. Beberapa faktor menunjukkan pengaruhnya terhadap aktivitas ALT, seperti jenis kelamin dan obesitas (Woreta & Alqahtani, 2014). Pria cenderung memiliki aktivitas ALT serum yang lebih tinggi dibandingkan wanita. Pada pria, kapasitas penyimpanan lemak subkutan secara signifikan lebih rendah, secara dominan akibat pengaturan hormon seksual, sehingga kelebihan lemak dalam tubuh ditempatkan lebih cepat ke jaringan lain pada pria diantaranya intraabdominal, perivaskular, otot skeletal, hepar dan pankreas (Buday *et al.*, 2015). ALT memiliki konsentrasi yang tinggi di dalam hepatosit dan sangat rendah pada jaringan yang lain. Sebaliknya, AST terdapat pada beberapa jaringan lain termasuk otot (jantung, lurik, polos), ginjal, dan otak (Herlong & Mitchell, 2012). Dengan demikian, ALT bersifat lebih spesifik untuk injuri hati dibanding AST. Rasio AST/ALT lebih dari lima, terutama jika ALT normal atau sedikit meningkat, menunjukkan injuri jaringan ekstrahepatik, seperti otot lurik pada rhabdomyolisis atau latihan fisik yang berat. AST terdapat dalam sitoplasma dan mitokondria, sedangkan ALT hanya terdapat pada sitoplasma.



Gambar 2.1

Lokasi AST dan ALT dalam hepatosit

ALT hanya berada pada sitoplasma, sementara AST berada pada sitoplasma dan mitokondria (Woreta & Alqahtani, 2014)



Gambar 2.2

Konsentrasi ALT dan AST berdasarkan lokasi hepatosit pada triad portal (Woreta & Alqahtani, 2014).

Sekitar 80% dari aktivitas AST di hati berasal dari isoenzim mitokondria, sedangkan aktivitas AST serum berasal dari isoenzim sitosolik pada orang sehat.

Menilai bentuk dan derajat dari peningkatan enzim hati dapat membantu

menjelaskan penyebab dari injuri hati dan tes diagnostik selanjutnya serta tatalaksananya. Beberapa tipe dari injuri sel hati dapat menyebabkan peningkatan moderat dari kadar aminotransferase serum. Kadar aminotransferase lebih dari 300 IU/L tidak spesifik dan dapat muncul pada beberapa tipe gangguan hati (Longo *et al.*, 2010). Peningkatan masif dengan kadar aminotransferase yang lebih dari 1000 IU/L hampir eksklusif terdapat pada gangguan yang berhubungan dengan injuri hepatoseluler ekstensif, paling sering disebabkan oleh injuri hati akibat toksin dan obat-obatan, injuri hati iskemik akut, atau hepatitis viral akut. Hepatitis autoimun yang parah atau *Wilson disease* juga dapat menyebabkan peningkatan aminotransferase. Konsentrasi tertinggi ALT terdapat pada hepatosit periportal dan konsentrasi terendah di dalam hepatosit sekitar vena sentral. AST, bagaimanapun, terdapat di dalam hepatosit pada kadar yang lebih konstan.

2.2.2 Pengaruh Injuri Hati akibat Injeksi CCl₄ Terhadap Kadar ALT dan AST Serum

Paparan CCl₄ pada berbagai komponen hati menimbulkan proses yang kompleks untuk melawan toksisitasnya. Metabolisme CCl₄ pada hati memproduksi radikal bebas (Sancheti *et al.*, 2013), dan memicu stres oksidatif yang diketahui sebagai mekanisme patologis yang berkontribusi pada inisiasi dan progresi dari injuri hati (Li *et al.*, 2015). Stres oksidatif selanjutnya akan menginisiasi produksi dari sitokin-sitokin inflamasi (Heeba and Morsy, 2015), menyebabkan apoptosis dan nekrosis hepatosit, menginduksi inflamasi, dan lebih jauh memicu fibrogenesis (Heeba and Mahmoud, 2014).

Karbon tetraklorida (CCl₄) dimediasi oleh sitokrom P450 untuk membentuk radikal bebas triklorometil, CCl₃, dan dengan oksigen membentuk radikal bebas triklorometilperoksi, CCl₃OO (Yanguas *et al.*, 2016). Radikal bebas ini dapat terikat dengan molekul-molekul seluler (asam nukleat, protein, dan lipid) dan merusak

proses seluler penting seperti metabolisme lipid, menghasilkan degenerasi lemak.

Terjadi proses inisiasi reaksi rantai peroksidasi lipid yang merusak asam lemak poliunsaturasi (PUFAs) dan menyebabkan injuri hepatosit (Sreelatha & Padma, 2010).

Peroksidasi lipid terdiri dari 3 proses : inisiasi, propagasi, dan terminasi.

Pada tahap inisiasi, prooksidan seperti radikal hidroksil mengabstraksi hidrogen alilik membentuk radikal lipid karbon terpusat ($L^{\cdot}$). Pada tahap propagasi, radikal lipid ($L^{\cdot}$) bereaksi cepat dengan oksigen membentuk radikal lipid peroksi ($LOO^{\cdot}$) yang mengabstraksi hidrogen dari molekul lipid lain membentuk radikal lipid ($L^{\cdot}$) baru (yang melanjutkan rantai reaksi) dan lipid hidroperoksida ($LOOH$). Pada tahap terminasi, antioksidan seperti vitamin E mendonasikan atom hidrogen pada spesies $LOO^{\cdot}$ dan membentuk radikal vitamin E koresponding yang bereaksi dengan $LOO^{\cdot}$ lain membentuk produk nonradikal. Ketika peroksidasi lipid terinisiasi, propagasi dari reaksi rantai akan terjadi hingga produk terminasi terbentuk (Yin *et al.*, 2011).

Membran hepatosit terikat dengan asam lemak, sehingga peroksidasi lipid dapat menyebabkan destruksi membran sel hepatosit (Khalaf *et al.*, 2009). Apabila proses terminasi oksidan tidak terjadi akibat jumlah antioksidan yang tidak adekuat pada sel maka akan terjadi degenerasi lemak membran hepatosit, menghasilkan hepatosit dengan permeabilitas yang meningkat dan menyebabkan pelepasan ALT dan AST dari hepatosit ke dalam peredaran darah (Woreta & Alqahtani, 2014).

Pada penelitian Kim *et al.* (2009), injeksi CCl_4 secara akut menyebabkan hepatotoksitas yang ditandai dengan perubahan histologis pada hati, termasuk nekrosis hepatosit, perubahan komponen lemak dari hepatosit yang berdekatan, degenerasi balon, inflamasi, serta infiltrasi dari limfosit dan sel Kupffer. Sedangkan

pada injeksi kronis CCl₄ ditemukan perubahan histologis termasuk perubahan komponen lemak yang ekstensif, *gross necrosis*, infiltrasi limfosit, dan hiperplasia sel Kupffer. Peroksidasi lipid hepatosit sebagai dasar dari peningkatan ALT dan AST serum dapat terus terjadi, baik injeksi CCl₄ akut maupun kronis, selama masih tersedia hepatosit yang belum dirusak.

Penelitian yang dilakukan Dong *et al.* (2016) pada tikus wistar selama 9 minggu ditemukan peningkatan yang signifikan pada kadar ALT dan AST serum akibat injeksi CCl₄ dibandingkan dengan tikus yang tidak diberi injeksi CCl₄. Hal ini membuktikan adanya toksisitas yang menyebabkan inflamasi pada hepatosit.

2.3 *Moringa oleifera*

Obat-obatan yang berasal dari bahan alam dianggap memiliki toksisitas yang lebih rendah dan risiko efek samping yang lebih sedikit dibandingkan dengan obat sintetik. Meskipun bahan aktif dari obat-obatan herbal belum diketahui, obat herbal banyak diresepkan oleh praktisi obat-obatan tradisional karena efek samping yang minimal dan harga yang murah (Aja *et al.*, 2014). *World Health Organization* (WHO) memperkirakan 4 milyar orang (80% populasi dunia) menggunakan obat-obatan herbal. Salah satu obat herbal yang banyak digunakan adalah *Moringa oleifera*, dikenal dengan istilah *drumstick-tree* atau *horse radish-tree* (Ranjan *et al.*, 2009).

2.3.1 Morfologi dan Taksonomi *Moringa oleifera*

Pohon *Moringa oleifera* tumbuh di negara-negara beriklim tropis dan subtropis dengan presipitasi tahunan 760-2500 mm (*Moringa oleifera* membutuhkan irigasi kurang dari 800 mm) dan temperatur 18-28 °C. Pohonnya dapat tumbuh pada berbagai jenis tanah dengan pH 4.5-8, pada ketinggian hingga 2000 m di atas permukaan laut (Nouman *et al.*, 2014). Semua bagian dari pohon

Moringa oleifera digunakan secara tradisional untuk banyak tujuan di antaranya sebagai sumber nutrisi dan obat-obatan, terutama daunnya (Popola & Obembe, 2013). Daunnya kaya akan protein, mineral, beta-karoten, dan antioksidan. Sebagai obat-obatan tradisional, daun *Moringa oleifera* digunakan untuk mengobati malaria, demam tifoid, penyakit akibat parasit, arthritis, penyakit kulit, penyakit genitourinaria, hipertensi dan diabetes serta bermanfaat bagi ibu yang sedang menyusui (laktasi) dan meningkatkan sistem imun (mengatasi gejala terkait HIV/AIDS) (Leone *et al.* 2015).

Tingkatan taksonomi *Moringa oleifera*

(Ganatra Tejas H *et al.*, 2012) :

Kingdom - Plantae

Sub kingdom - Tracheobionta

Super Division -Spermatophyta

Division - Magnoliophyta

Class - Magnoliopsida

Subclass - Dilleniidae

Order - Capparales

Family - Moringaceae

Genus – Moringa

Species – oleifera



Gambar 2.3 (kiri) Daun *Moringa oleifera*;
(kanan) Pohon *Moringa oleifera*
(Moloff *et al.*, 2009)

2.3.2 Daun *Moringa oleifera*: Kandungan dan Aktivitas Antioksidan

Penangkalan radikal-radikal bebas merupakan mekanisme antioksidan mayor untuk menghambat reaksi rantai dari peroksidasi lipid. Antioksidan mengatasi kerusakan oksidatif secara tidak langsung dengan meningkatkan pertahanan alami dari sel dan/atau secara langsung dengan penangkapan radikal bebas. Antioksidan seperti superoksida dismutase (SOD) dapat menangkap anion superoksida, sedangkan glutathion (GSH) bertanggungjawab untuk menyingkirkan H_2O_2 (Dunning *et al.*, 2013). Secara jelas terjadi kenaikan pada enzim antioksidan seperti SOD, Katalase, dan GSH serta kapasitas total antioksidan setelah pemberian ekstrak daun *Moringa oleifera* pada hewan yang diintoksikasi CCl_4 (El-bakry *et al.*, 2016).

Moringa oleifera juga memiliki berbagai macam kandungan antioksidan seperti Vitamin (A, C, E), Polifenol (Flavonoid & Asam Fenolik (kaempferol, rhamnetin, quersitin, asam klorogenik, rutin, apigenin)) (Karthivashan *et al.*, 2013), Alkaloid, Glukosinolat, Tanin, Saponin (Leone *et al.*, 2015). Senyawa fenolik ini merupakan pertahanan melawan stres oksidatif dengan bekerja sebagai agen reduktor melalui pengambilan oksigen dan donor atom hidrogen sehingga selanjutnya menstabilisasi radikal bebas, membentuk senyawa stabil yang tidak menginisiasi atau mempropagasikan reaksi oksidasi (El-bakry *et al.*, 2016).

1. Vitamin

Daun segar *Moringa oleifera* dilaporkan mengandung 11.300-23.000 IU vitamin A. Vitamin A berperan dalam banyak proses fisiologis seperti penglihatan, reproduksi, pertumbuhan dan perkembangan embrionik, peningkatan sistem imun, diferensiasi sel, proliferasi dan apoptosis sel, perlindungan terhadap jaringan epitel, dan fungsi otak. Daun segar *Moringa*

oleifera juga mengandung karotenoid (pro-vitamin A) dengan kadar 6.6–6.8 mg/100 g β -carotene, lebih tinggi dari wortel, labu, dan aprikot (6.9, 3.6 and 2.2 mg/100) (Leone *et al.*, 2015). β -carotene lebih terkonsentrasi pada daun kering, dengan rentang kadar 17.6 - 39.6 mg/100 g (Moyo *et al.*, 2011).

Moringa oleifera juga mengandung vitamin C. daun segarnya mengandung kira-kira 200 mg/100 g, lebih besar dari jeruk (Leone *et al.*, 2015). Vitamin C mempengaruhi sintesis dan metabolisme dari beberapa senyawa, seperti tirosin, asam folat dan triptofan, hidroksilasi dan glisin, prolin, lisin karnitin dan katekolamin. Vitamin C memfasilitasi konversi kolesterol menjadi asam empedu dan karenanya terjadi penurunan level kolesterol darah dan peningkatan absorpsi zat besi pada usus melalui pengurangan konversi ferik menjadi ferrous. Akhirnya, vitamin C berperan sebagai antioksidan, melindungi tubuh dari efek kerusakan akibat radikal bebas, polutan dan toksin (Chambial *et al.*, 2013). Vitamin C sensitif terhadap panas dan oksigen, sangat cepat teroksidasi, sehingga konsentrasinya di dalam daun kering *Moringa oleifera* lebih rendah dibandingkan dengan daun segar, turun menjadi 18,7 hingga 140 mg/100 g berat kering (Joshi & Mehta, 2010).

Daun segar *Moringa oleifera* merupakan sumber vitamin E (khususnya α - tokoferol) dengan kadar kira-kira kira-kira 9.0 mg/100 g, sama dengan kacang tanah (Leone *et al.*, 2015). Vitamin E bekerja sebagai antioksidan larut lemak, terlibat dalam modulasi ekspresi gen, penghambatan proliferasi sel, agregasi trombosit, adhesi monosit, dan regulasi massa tulang (Borel *et al.*, 2013). Prosedur pengeringan menyebabkan peningkatan kadar vitamin E hingga 74,45-122,16 mg/100 g berat kering (Moyo *et al.*, 2011).

2. Polifenol

Daun kering *Moringa oleifera* kaya akan polifenol. Konsentrasinya berkisar antara 2.090-12.200 mgGAE/100 g berat kering (Sreelatha & Padma, 2009) atau 1600-3400 mgTAE/100 g berat kering. Jumlah ini lebih besar dibanding dengan kandungan pada buah dan sayur. Kondisi lingkungan yang berbeda di berbagai negara asal, musim memanen, genetik dari tumbuhan, metode pengeringan, tingkat maturitas daun dan metode ekstraksi menjelaskan bervariasinya kadar polifenol (Sultana *et al.*, 2009).

Senyawa polifenol daun *Moringa oleifera* adalah flavonoid dan asam fenolik.

3. Flavonoid

Flavonoid merupakan sub-grup dari senyawa polifenolik yang memiliki struktur benzo- γ -pyrone dan terdapat di banyak tumbuhan, yang disintesis sebagai respon terhadap infeksi mikrobial (Kumar & Pandey, 2013).

Konsentrasi total flavonoid pada daun kering berkisar antara 5,059-12,16 mg/g berat kering, mirip atau bahkan lebih tinggi dibandingkan dengan kandungan di dalam berbagai sayur dan buah (Coppin *et al.*, 2013).

Konsentrasi total flavonoid dalam daun kering yang dibekukan berkisar antara 21,0-61,62 mgRE/g berat kering (Zhang *et al.*, 2011). Mirisetin, quersetin, dan kaempferol merupakan jenis flavonoid utama yang ditemukan dalam daun *Moringa oleifera*. Dalam daun kering, konsentrasi mirisetin kira-kira 5,804 mg/g berat kering, sementara konsentrasi quersetin dan kaempferol berkisar antara 0,207-7,57 mg/g berat kering dan 4,59 mg/g berat kering yang tidak terdeteksi (Singh *et al.*, 2009). Kandungan yang lebih tinggi ditemukan pada daun kering yang dibekukan. Konsentrasi quersetin

dan kaempferol berkisar antara 5,47-16,64 mg/g dan 1,5-3,5 mg/g berat kering (Amaglo *et al.*, 2010). Flavonoid lain, seperti luteolin, apigenin, daidzein dan genistein, ditemukan dalam konsentrasi yang tidak terdeteksi pada daun *Moringa oleifera* (Leone *et al.*, 2015).

4. Asam Fenolik

Asam fenolik merupakan sub-grup dari senyawa fenolik yang berasal dari asam hidroksibenzoik dan asam hidroksisinamik, yang secara alami terdapat pada tumbuhan. Asam fenolik banyak dipelajari sebagai komponen antioksidan, antiinflamasi, antimutagenik, dan antikanker (Verma *et al.*, 2013). Pada daun kering, kandungan terbanyak adalah asam galat, dengan konsentrasi kira-kira 1,034 mg/g berat kering. Konsentrasi dari klorogenik dan asam kafeik berkisar antara 0,018-0,489 mg/g berat kering (Singh *et al.*, 2009). Beberapa senyawa ini ditemukan lebih banyak dalam daun kering yang dibekukan.

5. Alkaloid

Alkaloid merupakan kelompok dari kandungan kimia alami yang mengandung basis atom nitrogen. Nitrogen dapat ditemukan dalam bentuk amine primer (RNH_2), amine sekunder (R_2NH) atau amine tersier (R_3N). Pada penambahan karbon, hidrogen, dan nitrogen, kebanyakan alkaloid mengandung oksigen (Cushnie *et al.*, 2014). Keberadaan dari senyawa-senyawa ini telah dikonfirmasi dalam daun *Moringa oleifera* (Kasolo *et al.*, 2010). Beberapa senyawa ini, seperti *N*, α -l-rhamnopyranosyl vincosamide, 4-(α -l-rhamnopyranosyloxy) phenylacetone nitrile (niazirin), pyrrolemarumine 4"-O- α -l-rhamnopyranoside, 4'-hydroxy phenylethanamide- α -l-rhamnopyranoside (marumoside A) and its 3-O- β -d-glucopyranosyl-

derivative (marumoside B) dan methyl 4-(α -l-rhamnopyranosyloxy)-benzylcarbamate berhasil diisolasi dari daun *Moringa oleifera* namun masih belum diketahui kadarnya (Sahakitpichan *et al.*, 2011).

6. Glukosinolat

Glukosinolat merupakan kelompok metabolit sekunder dari tumbuhan.

Secara struktural merupakan β -S-glucosida dari thio-oxime-O-sulfates dan disintesis dari asam amino. Secara umum, sekitar 116 dan 63 mg/g berat kering pada daun *Moringa oleifera* muda dan tua (Forster *et al.*, 2015). Kadar ini mendekati atau bahkan lebih banyak dibandingkan dengan kadar yang ditemukan pada sayuran krusiferous (brokoli, kubis, lobak). 4-O-(α -l-rhamnopyranosyloxy)-benzyl glucosinolate telah diidentifikasi sebagai glukosinolat daun dominan dari *Moringa oleifera*. Konsentrasi dari 4-O-(α -l-rhamnopyranosyloxy)-benzyl glucosinolate berkisar antara 21,84-59,4 mg/g berat kering (Leone *et al.*, 2015).

7. Tanin

Tanin merupakan senyawa fenolik larut air yang terikat pada dan mempresipitasi alkaloid, gelatin, dan protein lain. Tanin berfungsi sebagai antikanker, antiatherosklerosis, antiinflamasi, antihepatotoksik, antibakterial, dan anti-HIV (aktivitas replikasi) (Kancheva & Kasaikina, 2013). Konsentrasi tanin dalam daun *Moringa oleifera* berkisar antara 13,2-20,6 gTAE/kg dalam daun kering dan antara 5,0-12,0 gTAE/kg dalam daun kering yang dibekukan (Bhatta *et al.*, 2012). Konsentrasi ini lebih tinggi daripada yang ditemukan pada kacang (Leone *et al.*, 2015).

8. Saponin

Saponin merupakan kelompok senyawa alami yang terdiri dari *isoprenoidal-derived aglycone, designated genin* atau sapogenin (Augustin *et al.*, 2011). Konsentrasi saponin dalam daun kering *Moringa oleifera* kira-kira 50 gDE/kg berat kering, sementara daun kering yang dibekukan berkisar antara 64-81 gDE/kg berat kering (Leone *et al.*, 2015). Walaupun beberapa diantaranya memiliki efek samping hemolitik, saponin memiliki efek anti-kanker (Tian *et al.*, 2013).

2.3.3 *Moringa oleifera* : Pengaruh terhadap ALT & AST

Peroksidasi lipid secara umum merupakan proses dimana oksidan seperti radikal bebas merusak lipid seperti PUFAs yang terdapat pada membran sel hepatosit apabila proses ini tidak diterminasi. Rusaknya membran sel dapat mengakibatkan pelepasan alanin aminotransferase (ALT) dan aspartat aminotransferase (AST) ke dalam sirkulasi sehingga terjadi peningkatan kadarnya dalam serum (Ahsan *et al.*, 2009).

Seperti yang sudah dijelaskan sebelumnya, peroksidasi lipid terdiri atas 3 tahap yaitu inisiasi, propagasi, dan terminasi. Pada tahap terminasi peroksidasi lipid, antioksidan mendonasikan atom hidrogen pada spesies $LOO^{\bullet}$ dan membentuk radikal koresponding yang bereaksi dengan $LOO^{\bullet}$ lain membentuk produk nonradikal. Keberadaan antioksidan dari *Moringa oleifera* berkontribusi dalam proses peroksidasi lipid untuk melakukan terminasi terhadap oksidan lipid menjadi produk nonradikal dan menjaga membran sel dari kerusakan yang selanjutnya mencegah pelepasan ALT dan AST (Yin *et al.*, 2011).

2.3.4 *Moringa oleifera* : Perhatian Khusus

Oksalat dan fitat merupakan senyawa anti-nutrisi akan terikat dengan mineral sehingga penyerapan mineral di intestinal menjadi terhambat. Daun

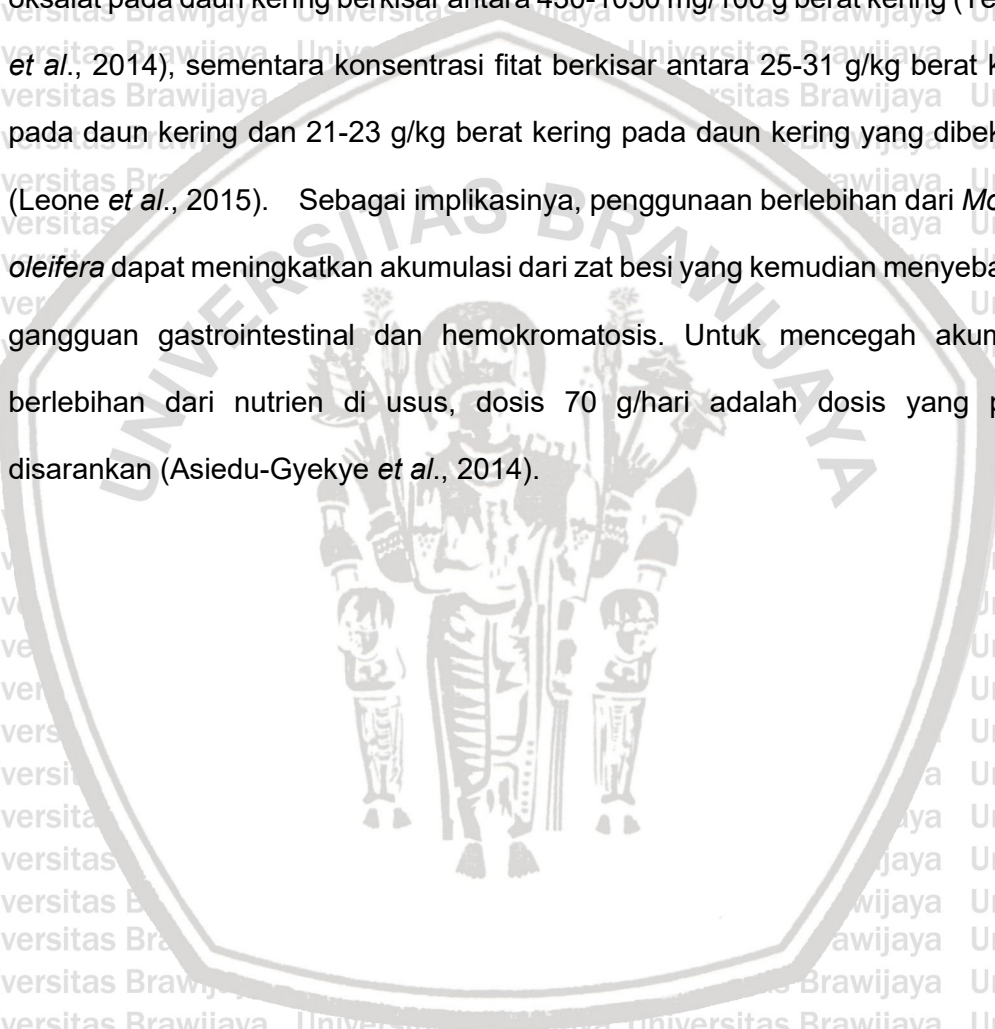
Moringa oleifera mengandung senyawa ini dalam jumlah besar. Kandungan oksalat pada daun kering berkisar antara 430-1050 mg/100 g berat kering (Teixeira

et al., 2014), sementara konsentrasi fitat berkisar antara 25-31 g/kg berat kering pada daun kering dan 21-23 g/kg berat kering pada daun kering yang dibekukan

(Leone et al., 2015). Sebagai implikasinya, penggunaan berlebihan dari *Moringa oleifera* dapat meningkatkan akumulasi dari zat besi yang kemudian menyebabkan

gangguan gastrointestinal dan hemokromatosis. Untuk mencegah akumulasi berlebihan dari nutrisi di usus, dosis 70 g/hari adalah dosis yang paling

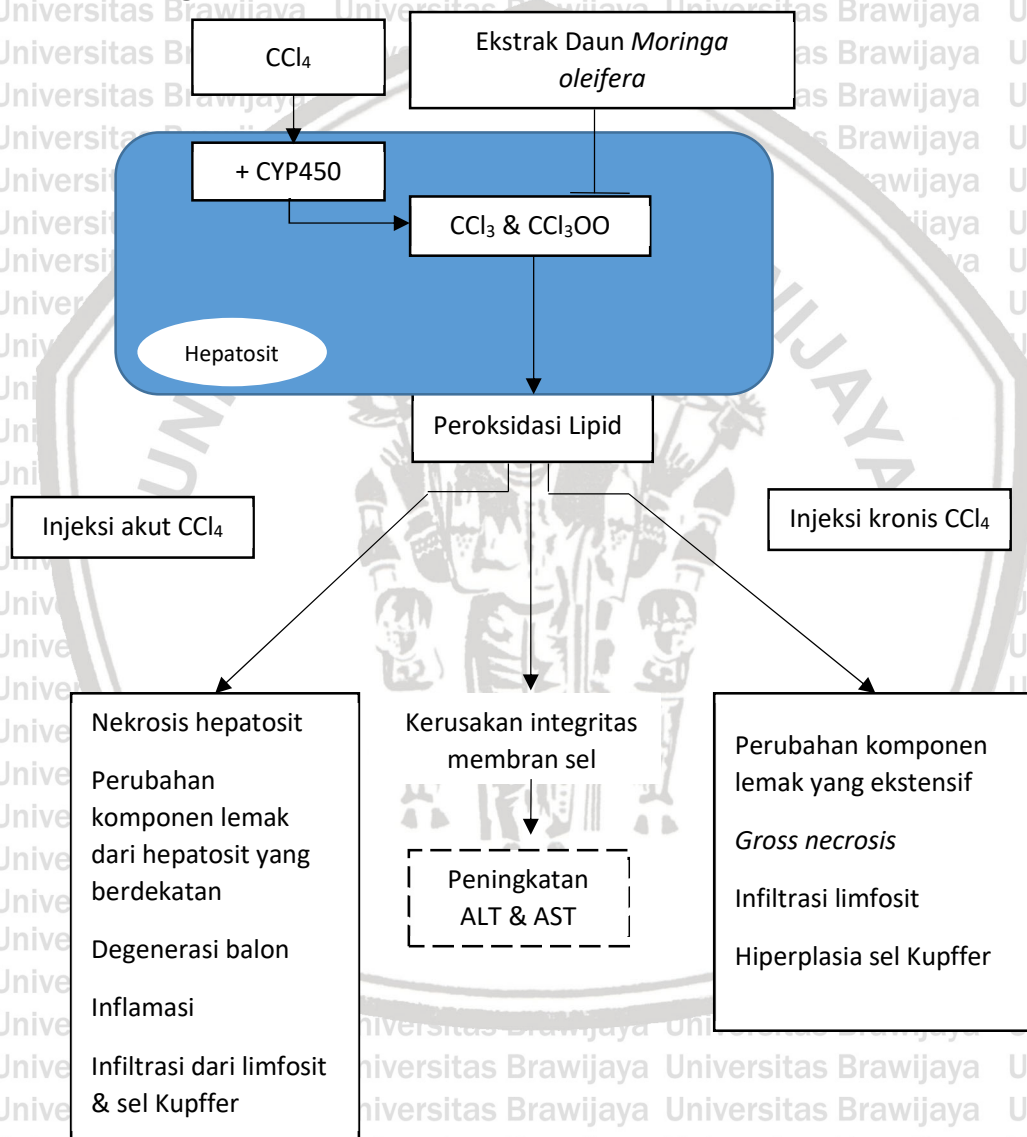
disarankan (Asiedu-Gyekye et al., 2014).



BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Keterangan :

➔ : mendorong/memicu

⎓ : yang diperiksa

⊥ : menghambat/ mengeliminir

Karbon tetraklorida (CCl_4) dimediasi oleh sitokrom P450 untuk membentuk radikal bebas triklorometil, CCl_3 , dan dengan oksigen membentuk radikal bebas triklorometilperoksi, CCl_3OO (Yanguas *et al.*, 2016). Radikal bebas ini dapat terikat dengan molekul-molekul seluler (asam nukleat, protein, dan lipid) dan merusak proses seluler penting seperti metabolisme lipid, menghasilkan degenerasi lemak.

Terjadi proses inisiasi reaksi rantai peroksidasi lipid yang merusak asam lemak poliunsaturasi (PUFAs) dan menyebabkan injuri hepatosit (Sreelatha & Padma, 2010). Pemberian CCl_4 menyebabkan kerusakan oksidatif yang ditunjukkan melalui peningkatan kebocoran laktat dehidrogenase (LDH), kadar malondaldehid (MDA) hepatic, dan penurunan signifikan dari konsentrasi glutathion (GSH), katalase (CAT), superoksida dismutase (SOD), glutathion peroksidase (GPX), dan aktivitas glutathion reductase (GR). Peroksidasi lipid menghasilkan produk yang salah satunya berupa 4- hidroksinenal (4-HNE). Dalam kondisi toksik, 4-HNE memicu apoptosis melalui: (i) 4-HNE dapat berdifusi dan berinteraksi dengan Fas (CD95/Apo1) pada membran plasma dan mengaktifasi ekspresinya untuk memediasi sinyal apoptosis melalui aktivasi kinase hilir (regulator sinyal apoptosis kinasi 1 atau ASK1 dan JNK), yang menyebabkan aktivasi dari eksekusiner kaspase-3; (ii) 4-HNE berinteraksi dengan sitoplasmik p53 yang menyebabkan induksi, fosforilasi, dan translokasi nuklear. Di dalam nukleus, p53 menghambat transkripsi gen antiapoptotik (Bcl2) dan memicu transkripsi dari gen proapoptotic (Bax) atau gen siklus sel (p21) yang mengarah pada aktivasi eksekusiner kaspase-3 (Ayala *et al.*, 2014).

Hepatosit yang rusak melepaskan sitokin ($\text{TGF-}\beta$, *tumor necrosis factor* α ($\text{TNF-}\alpha$), *epidermal growth factor* (EGF) dan *insulin-like growth factor* (IGF)) yang bertanggungjawab dalam aktivasi sel Kupffer melepaskan sitokin inflamasi (TNF-

α , interferon γ (INF- γ), IL-6), radikal bebas, dan faktor pertumbuhan (*platelet-derived growth factor* (PDGF), CTGF) yang menyebabkan aktivasi sel stelata hepatik (HSC) dan proliferasinya (Liu *et al.*, 2012). Proliferasi HSC yang terjadi merupakan proses kunci fibrogenesis.

Pada penelitian Kim *et al.* (2009), injeksi CCl₄ secara akut menyebabkan perubahan histologis pada hati, termasuk nekrosis hepatosit, perubahan komponen lemak dari hepatosit yang berdekatan, degenerasi balon, inflamasi, dan infiltrasi dari limfosit & sel Kupffer. Sedangkan pada injeksi CCl₄ kronis ditemukan perubahan histologis termasuk perubahan komponen lemak yang ekstensif, *gross necrosis*, infiltrasi limfosit, dan hiperplasia sel Kupffer. Aktivasi HSC sebagai penyebab fibrosis hati dapat dihasilkan dari injeksi kronis CCl₄.

Pada injeksi CCl₄ baik akut maupun kronis menyebabkan peningkatan kadar alanin aminotransferase (ALT) dan aspartat aminotransferase (AST) serum akibat peningkata permeabilitas membran sel sebagai hasil dari stres oksidatif. AST terdapat dalam sitoplasma dan mitokondria hepatosit, sedangkan ALT hanya terdapat pada sitoplasma hepatosit (Ahsan *et al.*, 2009).

Ekstrak daun *Moringa oleifera* memiliki kandungan antioksidan seperti Vitamin (A, C, E), Polifenol (Flavonoid & Asam fenolik), Alkaloid, Glukosinolat, Tanin, Saponin (Leone *et al.*, 2015). Penangkalan radikal-radikal bebas merupakan mekanisme antioksidan mayor untuk menghambat reaksi rantai dari peroksidasi lipid dimana pada tahap terminasi peroksidasi lipid, antioksidan mendonasikan atom hidrogen pada spesies CCl₃OO $\cdot$ dan membentuk radikal koresponding yang bereaksi dengan CCl₃OO $\cdot$ lain membentuk produk nonradikal (Yin *et al.*, 2011). Pemberian ekstrak daun *Moringa oleifera* secara signifikan

menurunkan stres oksidatif akibat paparan CCl_4 sehingga mencegah terjadinya kerusakan integritas membran sel serta apoptosis hepatosit.

3.2 Hipotesis Penelitian

1. Pemberian ekstrak daun *Moringa oleifera* berpengaruh terhadap penurunan kadar alanin aminotransferase (ALT) serum tikus model fibrosis hati akibat injeksi kronis karbon tetraklorida (CCl_4).
2. Pemberian ekstrak daun *Moringa oleifera* berpengaruh terhadap penurunan kadar aspartat aminotransferase (AST) serum tikus model fibrosis hati akibat injeksi kronis karbon tetraklorida (CCl_4).



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian berbentuk eksperimental laboratorium dengan design *true experimental laboratory*. Penelitian ini termasuk ke dalam eksperimental *in vivo* pada hewan coba tikus. Metode yang digunakan adalah *randomized posttest only controlled group design*. Perlakuan yang diberikan pada hewan coba yaitu injeksi menggunakan CCl_4 untuk memicu injuri hepatosit dan pemberian ekstrak daun *Moringa oleifera*. Sebelum diberi perlakuan, hewan coba diadaptasikan terlebih dahulu selama 7 hari kemudian dibagi menjadi 5 kelompok secara acak, sebagai berikut :

1. Kelompok negatif (KNeg): kelompok tikus diberi injeksi NaCl 0.9% 1 cc/kgBB IP 2x/minggu selama 14 minggu, dan diberi sonde aquades 2,5 cc/kgBB sebagai plasebo setiap hari selama 14 minggu. Tikus dikorbankan 48 jam paska injeksi NaCl terakhir.
2. Kelompok positif (KPos): kelompok tikus diberi injeksi CCl_4 10% IP 1 cc/kgBB 2x/minggu selama 14 minggu dan diberi sonde aquades 2,5 cc/kgBB sebagai plasebo setiap hari selama 14 minggu. Tikus dikorbankan 48 jam paska injeksi CCl_4 terakhir.
3. Kelompok perlakuan 1 (KP1): kelompok tikus diberi injeksi CCl_4 10% IP 1 cc/kgBB 2x/minggu selama 14 minggu dan diberi sonde ekstrak daun *Moringa oleifera* dosis 150 mg/kgBB/hari setara dengan 5.00 cc/kgBB/hari selama 14 minggu. Tikus dikorbankan 48 jam paska injeksi CCl_4 terakhir.

4. Kelompok perlakuan 2 (KP2): kelompok tikus diberi injeksi CCl_4 10% IP 1 cc/kgBB 2x/minggu selama 14 minggu dan diberi sonde ekstrak daun

Moringa oleifera dosis 300 mg/kgBB/hari setara dengan 7.50 cc/kgBB/hari selama 14 minggu. Tikus dikorbankan 48 jam paska injeksi CCl_4 terakhir.

5. Kelompok perlakuan 3 (KP3): kelompok tikus diberi injeksi CCl_4 10% IP 1 cc/kgBB 2x/minggu selama 14 minggu dan diberi sonde ekstrak daun

Moringa oleifera dosis 600 mg/kgBB/hari setara dengan 10 cc/kgBB/hari selama 14 minggu. Tikus dikorbankan 48 jam paska injeksi CCl_4 terakhir.

4.2 Populasi dan Sampel

Sampel penelitian ini menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar. Adapun kriteria inklusi dan eksklusi yaitu:

Kriteria inklusi:

1. Tikus jantan
2. Umur $\pm$ 3 bulan
3. Berat badan 150-250 gram
4. Belum pernah mengalami perlakuan apapun
5. Tikus terlihat sehat (gerak aktif dan bulu tidak rontok)

Kriteria eksklusi :

1. Tikus tidak mau makan selama penelitian
2. Tikus sakit atau mati selama perlakuan (bukan akibat injeksi CCl_4)

4.2.1 Estimasi Jumlah Sampel

Jumlah sampel yang akan digunakan dalam eksperimen dengan metode *random* (acak), menggunakan $t(t-1)(r-1) \geq 15$, dimana:

t : banyaknya kelompok perlakuan

r : jumlah pengulangan (replikasi) yang dipakai sebagai jumlah sampel

Pada penelitian ini $t=5$, sehingga didapatkan pengulangan sebesar :

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

$$4(r-1) \geq 15$$

$$4r-4 \geq 15$$

$$4r \geq 15+4$$

$$r \geq 19/4$$

$$r \geq 4,75 \text{ (dibulatkan menjadi 5)}$$

Jadi, jumlah sampel untuk pengulangan yang diperlukan di setiap kelompok perlakuan minimal 5. Sehingga total semua tikus yaitu $5 \times 5 = 25$ tikus. Penelitian ini merupakan penelitian payung yang menggunakan 8 kali pengulangan pada setiap kelompok perlakuan tikus sehingga kemungkinan kekurangan data akibat faktor objek penelitian dapat diminimalisir.

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi FKUB untuk proses pemeliharaan dan perlakuan hewan coba tikus berupa injeksi CCl_4 dan pemberian ekstrak daun *Moringa oleifera*. Analisis kadar ALT dan AST serum dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik FKUB. Penelitian rencana akan dilakukan selama 14 minggu, mulai dilaksanakan bulan Juli sd Oktober 2018.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Paparan ekstrak daun *Moringa oleifera*

4.4.2 Variabel Terikat

Kadar ALT dan AST serum

4.5 Definisi Operasional

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus *Rattus norvegicus* strain wistar yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi FKUB. Tikus dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan (KPos, KNeg, KP1, KP2, KP3) dengan masing-masing kelompok berjumlah 5 ekor.
2. Diet normal berupa pakan standart konsentrat BR-1 yang dicampur tepung dengan perbandingan 3:1 dan air secukupnya.
3. Paparan CCl_4 adalah pemberian injeksi CCl_4 10% (CCl_4 : corn oil = 1:9 volume) intraperitoneal dengan dosis 1,0 ml/KgBB, 2 kali seminggu (Li, et al., 2012) selama 14 minggu.
4. *Moringa oleifera* (MO) yang digunakan berupa serbuk yang diperoleh dari UPT Materia Medica Batu, Malang.

5. Ekstrak MO diperoleh dengan metode ekstraksi maserasi menggunakan pelarut ethanol 96% (Sultana, et al., 2009).
6. Paparan *Moringa oleifera* adalah ekstrak daunnya melalui sonde setiap hari. Ada tiga kelompok dengan dosis pemberian yang berbeda-beda antara lain:
 - 150 mg/kgBB/hari
 - 300 mg/kgBB/hari
 - 600 mg/kgBB/hari
7. Ekstrak daun *Moringa oleifera* dicampurkan dengan aquades sedemikian rupa sehingga diperoleh dosis: 150 mg/kgBB/hari setara dengan 5 cc/kgBB/hari, 300 mg/kgBB/hari setara dengan 7.5 cc/kgBB/hari, dan 600 mg/kgBB/hari setara dengan 10 cc/kgBB/hari, diberikan sesuai jadwal yang ditentukan.
8. Sampel darah diambil dengan injeksi dari ventrikel kiri tikus kemudian serum dipisahkan dengan alat sentrifugasi MSE Mistral 1000.
9. Kadar ALT dan AST serum diperiksa dengan metode *Optimized UV-test* berdasarkan metode modifikasi IFCC (*International Federation of Clinical Chemistry*) tanpa *pyridoxal phosphate*.

4.6 Bahan dan Alat Penelitian

4.6.1 Alat dan Bahan untuk Pengeringan, Ekstraksi, dan Evaporasi daun *Moringa oleifera* (MO)

1. Alat

- a. Erlenmeyer 500 ml
- b. Orbital Shaker
- c. Kertas saring Whatman no. 1
- d. Rotary evaporator

2. Bahan

- a. Serbuk daun *Moringa oleifera*
- b. Pelarut ethanol 96%

4.6.2 Alat dan Bahan untuk Pemeliharaan Tikus (Kandang & Makanan)

1. Alat

- a. Kandang dari kotak berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm
- b. Alas sekam yang bersih dan kering serta diganti seminggu dua kali
- c. Tutup kandang dari anyaman kawat
- d. Botol air untuk minum tikus
- e. Wadah untuk pakan tikus
- f. Neraca sartorius untuk menimbang BB tikus dan makanan tikus
- g. Alat pembuatan pakan: baskom plastik, neraca sartorius, *handscoon*, gelas ukur, pengaduk, penggilingan pakan, nampan

2. Bahan

- a. Air
- b. Sekam
- c. Pakan tikus : konsentrat BR-1, tepung terigu, dan air secukupnya

4.6.3 Alat dan Bahan untuk Pembuatan dan Penyimpanan Larutan Karbon

Tetraklorida (CCl_4)

1. Alat

- a. Pipet
- b. *Beaker glass*
- c. Spatula
- d. Spuit
- e. Botol kaca berwarna gelap
- f. *Aluminium foil*

2. Bahan

- a. CCl_4
- b. Minyak jagung

4.6.4 Alat dan Bahan untuk Penyimpanan Larutan Natrium Klorida (NaCl)

1. Alat

Botol kaca gelap

2. Bahan

NaCl 0.9%

4.6.5 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Larutan *Moringa oleifera* (MO)

1. Alat

- a. 3 botol kaca gelap berlabel untuk 3 dosis yang berbeda
- b. Timbangan mikro
- c. Spatula-sendok laboratorium

2. Bahan

- a. Ekstrak daun *Moringa oleifera*
- b. Aquades sebagai pelarut

4.6.6 Alat dan Bahan untuk Injeksi Karbon Tetraklorida (CCl_4) dan Natrium Klorida (NaCl)

1. Alat

- a. Spuit 1 cc
- b. Jarum suntik sekali pakai

2. Bahan

Larutan CCl_4 dan NaCl

4.6.7 Alat dan Bahan untuk Sonde *Moringa oleifera* (MO) dan Aquades

1. Alat

Alat sonde

2. Bahan

- a. Larutan MO 150, 300, 600 mg/kgBB
- b. Aquades

4.6.8 Alat dan Bahan untuk Pembedahan Tikus & Pengambilan Sampel Darah

1. Alat

- a. Jarum pentul untuk fiksasi tikus
- b. Spuit untuk injeksi ketamin
- c. Kapas untuk alkohol
- d. Pinset anatomis
- e. Gunting
- f. Spuit untuk pengambilan sampel darah
- g. Vacutainer tutup merah (*non additive*)

2. Bahan

- a. Ketamin
- b. Alkohol

4.7.9 Alat dan Bahan untuk Pemisahan Serum dari Darah

1. Alat

- a. Alat sentrifugasi MSE Mistral 1000
- b. *Vacutainer* tutup merah (*no additive*) 3 mL
- c. Mikropipet
- d. Tip berwarna biru pada ujung mikropipet (*blue tip*)
- e. Tabung sentrifugasi 1,5 mL

2. Bahan

Sampel darah

4.7.10 Alat dan Bahan untuk Pemeriksaan Kadar ALT & AST Serum

1. Alat

HORIBA ABX Pentra C200

2. Bahan

a. Pemeriksaan ALT

Reagen : ABX Pentra ALT CP, reagen 1 (TRIS pH 7.15 140 mmol/L, L-alanine 700 mmol/L, LDH ≥ 2300 U/L, Sodium azide < 1 g/L), reagen 2 (2-oxoglutarate 85 mmol/L, NADH 1 mmol/L, Sodium azide < 1 g/L).

b. Pemeriksaan AST

Reagen : ABX Pentra AST CP, reagen 1 (TRIS pH 7.65 110 mmol/L, L-Aspartate 320 mmol/L, MDH ≥ 800 U/L, LDH ≥ 1200 U/L, Sodium azide < 1 g/L), reagen 2 (2-oxoglutarate 65 mmol/L, NADH 1 mmol/L, Sodium azide < 1 g/L).

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pengeringan, Ekstraksi, dan Evaporasi daun *Moringa oleifera* (MO)

Serbuk daun *Moringa oleifera* (80 mesh) sebanyak 50 gram diekstraksi dengan ethanol 96% sebanyak 500 mL selama 6 jam pada temperature ruang di dalam *orbital shaker*. Total serbuk Moringa yang diekstrak sebanyak 500 gram dengan total pelarut 5 L. Ekstrak dipisahkan dari residu dengan penyaringan menggunakan kertas saring Whatmann No 1. Residu diekstraksi 2 kali dengan pelarut yang baru dan ekstrak digabung. Ekstrak yang digabung dipekatkan dan dibebaskan dari pelarut dibawah tekanan rendah pada suhu 45 °C menggunakan *rotary evaporator*. Ekstrak kasar pekat yang telah dikeringkan ditimbang dan disimpan di dalam kulkas pada suhu -4 °C. tiap 100 gram serbuk daun kering yang diekstrak dengan ethanol 96% menghasilkan ekstrak sekitar 17 gram (Sultana *et al.*, 2009). Ekstrak yang dihasilkan dalam penelitian ini diperkirakan 85 gram.

4.7.2 Pemeliharaan Tikus (Kandang & Makanan)

1. Persiapan sebelum pemeliharaan

- a. Tikus *Rattus norvegicus* strain wistar didapatkan dari Laboratorium Farmakologi FKUB.
- b. Mempersiapkan kandang tikus untuk 5 kelompok perlakuan. Setiap kelompok terdiri atas 5 kandang di mana 1 kandang berisi 1 tikus.

Kandang diberi label sesuai dengan perlakuan, yaitu label

- Kelompok negatif: KNeg (1), KNeg (2), KNeg (3), KNeg (4), KNeg (5)
- Kelompok positif: KPos (1), KPos (2), KPos (3), KPos (4), KPos (5)
- Kelompok perlakuan 1: KP1(1), KP1(2), KP1(3), KP1(4), KP1(5),
- Kelompok perlakuan 2: KP2(1), KP2(2), KP2(3), KP2(4), KP2(5),

- Kelompok perlakuan 3: KP3(1), KP3(2), KP3(3), KP3(4), KP3(5)

c. Kandang ditutup dengan menggunakan anyaman kawat berongga

sehingga tikus tetap bisa bernafas dengan ventilasi udara yang cukup

d. Ruangan untuk menempatkan kandang bersuhu 25-28°C dengan kelembapan udara 50-70%.

e. Alas kandang berupa sekam dengan ketebalan secukupnya dan diganti dengan sekam yang baru dua kali dalam satu minggu.

2. Pemeliharaan tikus

a. Sebelum diberi perlakuan, tikus diadaptasikan terlebih dahulu selama satu minggu terhadap kondisi laboratorium. Tikus diberikan diet normal. Tikus ditimbang saat awal adaptasi dan akhir adaptasi untuk bisa dipantau bahwa tikus tidak mengalami penurunan berat badan dan tetap dalam kondisi yang sehat.

b. Minum yang diberikan setiap hari adalah aquades yang ditempatkan pada botol minum ukuran 100 mL dan ada pipa dengan bola katup tempat keluarnya air minum dan ini diletakkan di atas kawat penutup kandang.

c. Memberikan pakan yang berupa konsentrat BR-1 dan tepung terigu dengan perbandingan 3:1, dan ditambahkan air secukupnya. Berat pakan yang diberikan untuk setiap tikus sama, yaitu 40 gram.

d. Tikus dikeluarkan dari kandang untuk diberikan perlakuan seperti menimbang berat badan dan injeksi karbon tetraklorida (CCl_4). Sebelum memegang tikus, peneliti mendekatkan diri dengan tikus agar tikus mengetahui keberadaan orang disekitarnya dan

menghindari gigitan tikus. Pengeluaran tikus dari kandang dilakukan dengan memegang pangkal ekor tikus dan mengangkatnya keluar, tangan sisi lain dari peneliti memegang tubuh bagian atas dengan posisi kaki depan tikus diantara jari telunjuk dan jari tengah peneliti. Saat memegang bagian tubuh yang atas jangan terlalu kencang agar tikus dapat bernafas. Lalu, tangan lain memegang tubuh bagian bawah kemudian tikus diposisikan secara vertikal.

- e. Untuk kelompok negatif diinjeksi NaCl 0.9% dengan dosis 1 ml/kgBB dengan frekuensi dua kali seminggu yang digunakan sebagai plasebo setara dengan injeksi CCl₄ kelompok lain.
- f. Untuk kelompok positif dan kelompok negatif diberikan sonde aquades 2,5 cc/kgBB sebagai plasebo setara dengan sonde ekstrak daun *Moringa oleifera* pada kelompok lain .
- g. Memberikan sonde ekstrak daun *Moringa oleifera* dengan dosis 150 mg/kgBB/hari untuk KP1, 300 mg/kgBB/hari untuk KP2, dan 600 mg/kgBB/hari untuk KP3. Pemberian pertama bersamaan dengan injeksi pertama CCl₄ kemudian dilanjutkan setiap hari.

4.7.3 Pembuatan Larutan Karbon Tetraklorida (CCl₄)

1. Mengambil CCl₄ dengan pipet sebanyak 5 mL
2. Mempersiapkan minyak jagung dengan rasio perbandingan 1 CCl₄ : 9 minyak jagung
3. Melarutkan CCl₄ di dalam beaker glass dengan minyak jagung sehingga konsentrasi menjadi 10%

4.7.4 Pembuatan Larutan Natrium Klorida (NaCl)

Larutan NaCl yang digunakan dalam penelitian diperoleh dengan membeli dari pihak lain.

4.7.5 Pembuatan Larutan *Moringa oleifera* (MO)

1. Larutan *Moringa oleifera* 150 mg/kgBB

- Mengambil ekstrak daun *Moringa oleifera* menggunakan spatula-sendok laboratorium dan menimbanginya menggunakan timbangan mikro.
- Mencampurkan 2400 mg ekstrak daun *Moringa oleifera* dengan 80 cc aquades sehomogen mungkin di dalam botol kaca gelap sehingga 1 cc larutan mengandung 30 mg ekstrak daun. Setiap 1 kg BB tikus menerima 5.00 cc larutan MO.
- Memberi label botol kaca yaitu ekstrak MO 150 mg/kgBB
- Menyimpan larutan di dalam kulkas dan dikeluarkan saat hendak diberikan pada tikus.

2. Larutan *Moringa oleifera* 300 mg/kgBB

- Mengambil ekstrak daun *Moringa oleifera* menggunakan spatula-sendok laboratorium dan menimbanginya menggunakan timbangan mikro.
- Mencampurkan 4800 mg ekstrak daun *Moringa oleifera* dengan 120 cc air sehomogen mungkin di dalam botol kaca gelap sehingga 1 cc larutan mengandung 40 mg ekstrak daun. Setiap 1 kg BB tikus menerima 7.50 cc larutan MO.
- Memberi label botol kaca yaitu ekstrak MO 300 mg/kgBB
- Menyimpan larutan di dalam kulkas dan dikeluarkan saat hendak diberikan pada tikus.

3. Larutan *Moringa oleifera* 600 mg/kgBB

- a. Mengambil ekstrak daun *Moringa oleifera* menggunakan spatula-sendok laboratorium dan menimbanginya menggunakan timbangan mikro.
- b. Mencampurkan 9600 mg ekstrak daun *Moringa oleifera* dengan 160 cc air sehomogen mungkin sehingga 1 cc larutan mengandung 60 mg ekstrak daun. Setiap 1 kg BB tikus menerima 10.00 cc larutan MO.
- c. Memberi label botol kaca yaitu ekstrak MO 600 mg/kgBB
- d. Menyimpan larutan di dalam kulkas dan dikeluarkan saat hendak diberikan pada tikus.

4.7.6 Injeksi Karbon Tetraklorida (CCl_4) dan Natrium Klorida (NaCl)

1. Setelah adaptasi selama satu minggu, dilakukan injeksi CCl_4 secara intraperitoneal.
2. Untuk setiap injeksi dosisnya yaitu 1cc/kgBB setiap 2 kali per minggu selama 14 minggu untuk kelompok KPos, KP1, KP2, KP3. Injeksi CCl_4 didahului dengan penghitungan dosis CCl_4 berdasarkan berat badan tikus pada hari terkait.
3. Di bagian yang akan disuntik harus di bersihkan dulu dengan kapas yang diberi alkohol dengan arah sirkuler dari medial ke lateral.
4. CCl_4 disuntikkan di bagian kuadran kanan bawah abdomen untuk menghindari tertusuknya organ-organ vital.
5. Injeksi CCl_4 dapat menimbulkan kondisi stres pada tikus, untuk itu lakukan dengan teknik yang tepat, tenang, dan hati-hati.
6. 1 jarum untuk injeksi digunakan untuk 1 tikus saja. Saat hendak menginjeksi tikus yang lain, harus dilakukan penggantian jarum.

4.7.7 Sonde *Moringa oleifera* (MO) dan Aquades

1. Mengambil larutan MO di dalam botol berdasarkan dosis dan volume pemberian (berdasarkan perhitungan BB hari itu) sesuai jadwal kelompok perlakuan.
4. Menyonde semua tikus dengan volume 2.5 ml sehingga jika dosis MOnya tidak mencapai 2.5 ml ditambahkan Aquades hingga 2.5 ml. Aquades dimasukkan terlebih dahulu ke dalam spuit untuk meminimalkan MO yang tertinggal di dalam tabung spuit.
5. Memberikan sonde pada tikus dengan memasukkan alat sonde ke dalam mulut tikus

4.7.8 Pembedahan Tikus & Pengambilan Sampel Darah

Sebelum dilakukan pembedahan, tikus harus dieuthanasia terlebih dahulu.

Euthanasia ini dilakukan dengan injeksi ketamine 100. Berikut adalah tahapan yang harus dilakukan saat pembedahan :

- Tikus dieuthanasia terlebih dahulu dengan injeksi ketamine 100 sebanyak 0,35 cc
- Tikus ditempatkan di atas papan bedah berbahan lilin.
- Fiksasi 4 kaki tikus menggunakan jarum pentul, sedangkan fiksasi leher menggunakan pinset anatomis yang ujungnya ditancapkan pada papan lilin.
- Pembedahan dilakukan di bagian abdomen menggunakan gunting bengkok.
- Darah diambil menggunakan spuit secara langsung dari jantung tikus
- Darah dimasukkan pada tabung bertutup merah dan dibawa ke laboratorium biomedik untuk pemisahan serum.
- Pembedahan dilakukan 2 hari setelah pemberian injeksi terakhir

Setelah dilakukan pembedahan maka tubuh tikus dikuburkan dan area pembedahan dibersihkan.

4.7.9 Pemisahan Serum dari Darah (di Laboratorium Biomedik)

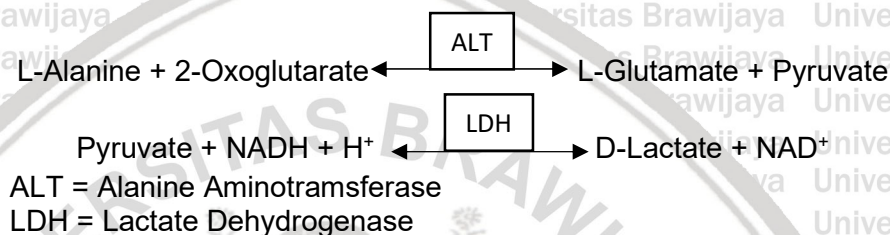
1. Membawa *vacutainer* tutup merah (*no additive*) berisi sampel darah tikus dari laboratorium farmakologi ke laboratorium biomedik
2. Membiarkan sampel darah selama 10-20 menit pada suhu ruangan sehingga terbentuk klot serum
3. Melakukan sentrifugasi dengan kecepatan 2000-3000 RPM selama 20 menit
4. Mengambil serum yang terbentuk menggunakan mikropipet tip warna biru dan memasukkannya ke dalam tabung sentrifugasi 1,5 mL untuk dibawa ke laboratorium patologi klinik
5. *Vacutainer* tutup merah, mikropipet, blue tip, dan tabung sentrifugasi bersifat sekali pakai (*disposable*)

4.7.10 Pemeriksaan Kadar ALT & AST Serum (di Laboratorium Patologi

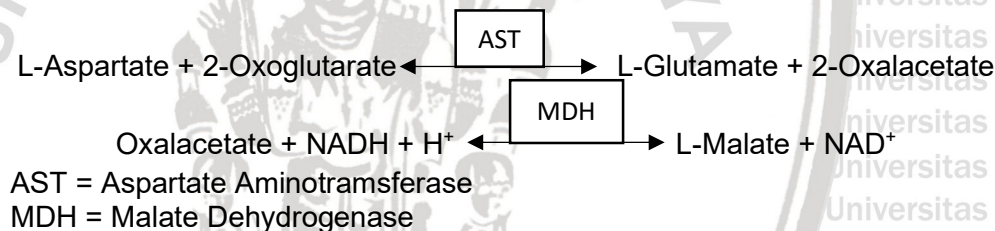
Klinik)

Optimized UV-test berdasarkan metode modifikasi IFCC (*International Federation of Clinical Chemistry*) tanpa pyridoxal phosphate, dengan prinsip reaksi sebagai berikut.

a. Reaksi ALT



b. Reaksi AST



4.8 Pengolahan Data

4.8.1 Uji Analisis

Teknis pengolahan data hasil penelitian dianalisis secara komputerisasi dengan menggunakan software *Statistical Product and Service Solution* (SPSS)

IBM 24 dengan tingkat signifikansi atau nilai probabilitas 0,05 ($p=0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$) dengan langkah pengujian sebagai berikut.

1. Uji asumsi data berupa uji normalitas menggunakan *Shapiro Wilk Test* dan uji homogenitas menggunakan *Levene Test* untuk menguji apakah data tersebar normal (parametrik) atau tidak tersebar normal (non parametrik).

2. Uji komparasi dilakukan dengan cara *One-Way ANOVA* > 2 kelompok untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian ekstrak daun *Moringa oleifera* terhadap kadar ALT dan AST serum tikus, dengan syarat:

- Sebaran data harus normal
- Varian data harus sama (homogen)

Namun jika data tidak homogen atau tidak tersebar normal, maka digunakan metode *Kruskal Wallis*.

3. Uji *Post Hoc Tukey* dilakukan untuk mengetahui pasangan kelompok sampel yang memberikan perbedaan yang signifikan pada data parametrik.

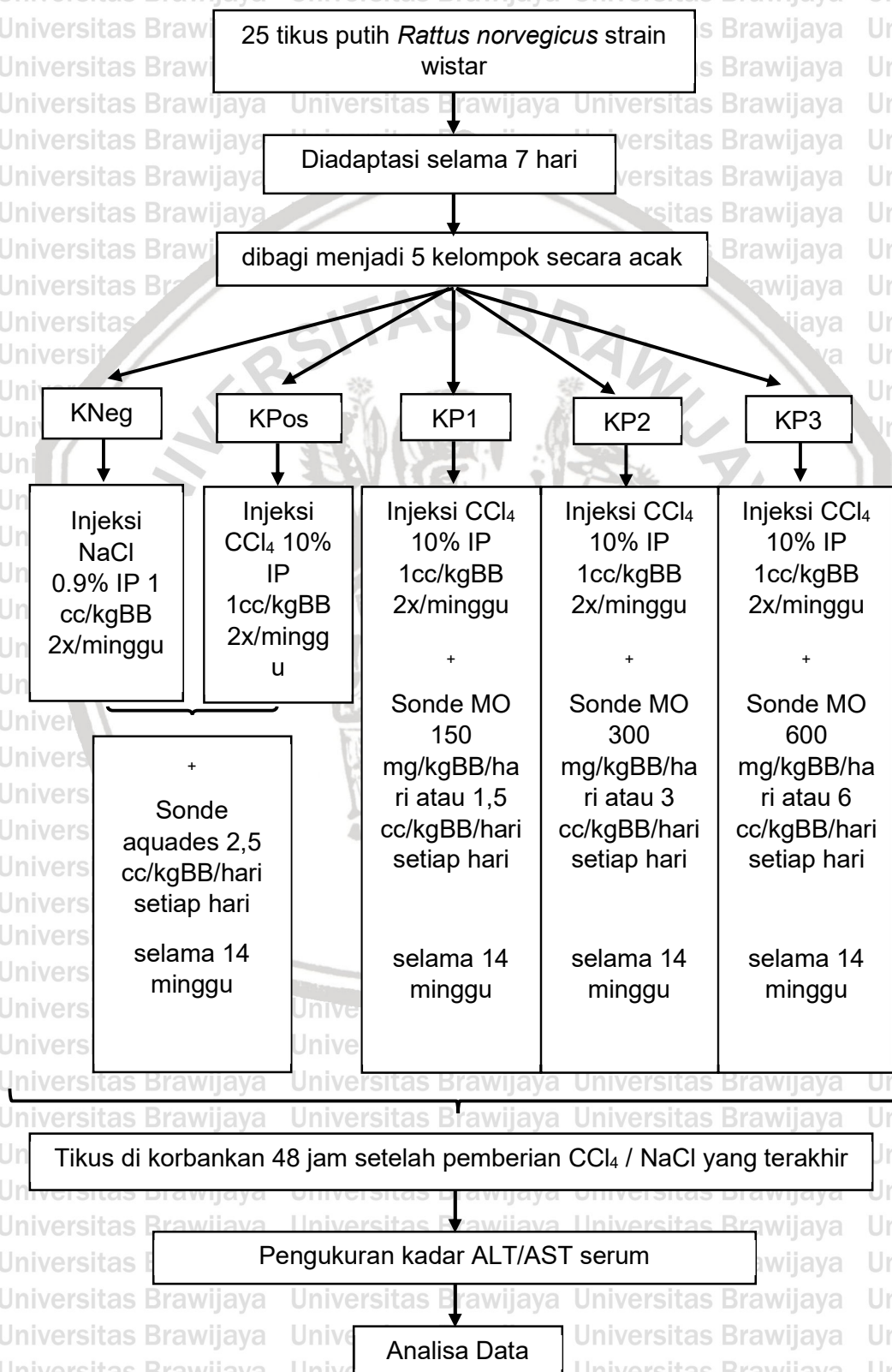
Jika data non parametrik maka menggunakan *Mann Whitney U Test*.

4.8.2 Penulisan dan Pelaporan Hasil Penelitian

Kelompok Perlakuan	Kadar Serum ALT (U/L)					Rerata	± SD
	1	2	3	4	5		
KNeg							
KPos							
KP1							
KP2							
KP3							

Kelompok Perlakuan	Kadar Serum AST (U/L)					Rerata	± SD
	1	2	3	4	5		
KNeg							
KPos							
KP1							
KP2							
KP3							

4.9 Alur Penelitian



BAB 5

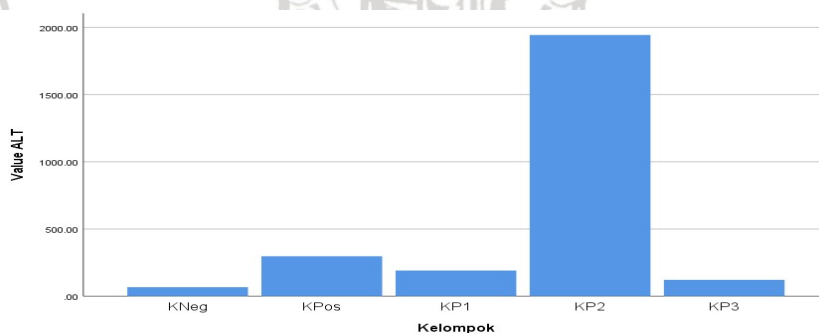
HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

Berdasarkan uji asumsi yang telah dilakukan pada data hasil penelitian, ditemukan bahwa data ALT maupun AST tidak terdistribusi normal dan tidak homogen sehingga analisis data selanjutnya dilakukan menggunakan uji nonparametrik.

Tabel 5.1 Hasil ALT dari 5 Kelompok Perlakuan

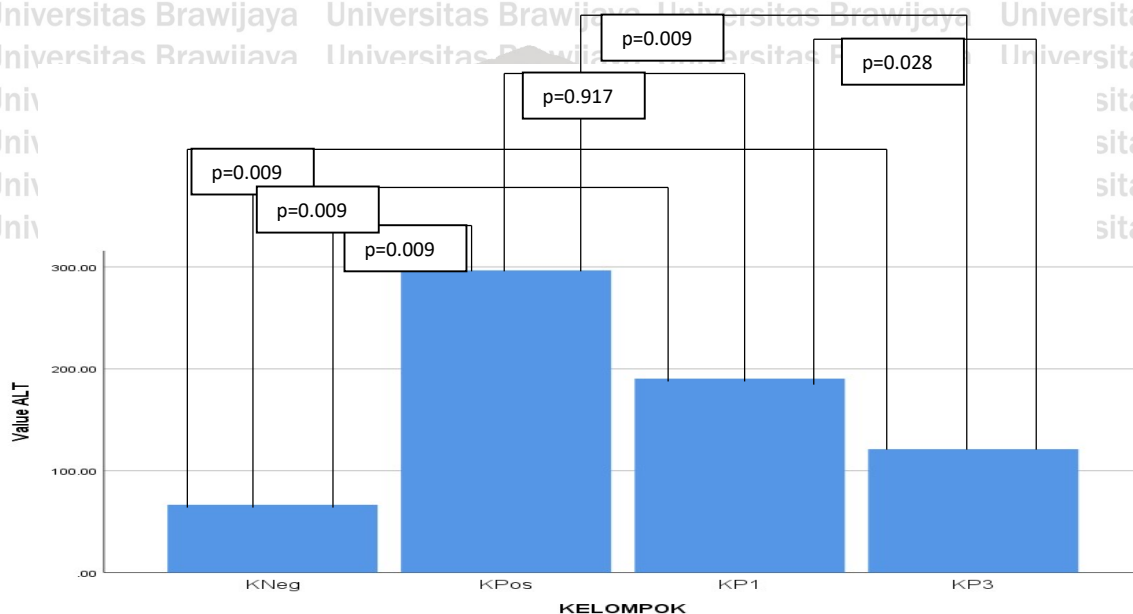
Kelompok Perlakuan	Kadar Serum ALT (U/L)					Rerata	± SD
	1	2	3	4	5		
KNeg	52	72	67	51	69	62.20	4.08
KPos	309	178	191	177	628	296.60	86.46
KP1	121	196	212	202	221	190.40	17.87
KP2	1416	1800	3116	1050	2336	1943.60	362.35
KP3	106	79	176	117	128	121.20	15.93



Gambar 5.1 Grafik rata-rata kadar ALT setiap kelompok perlakuan

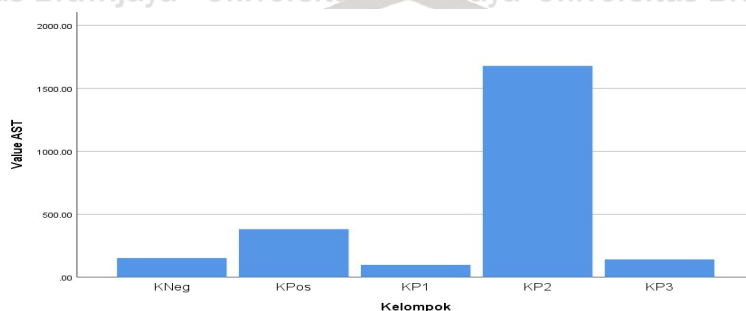
Ditemukan kadar ALT KP2 yang sangat tinggi dibandingkan kelompok perlakuan lain. Salah satu penyebab yang ditemukan adalah terjadinya hemolisis pada sampel darah KP2(3), KP2(4), dan KP 2(5) setelah disentrifugasi. Dengan ini penulis memutuskan untuk mengeksekusi KP2 dari uji analisis data.

Kelompok Perlakuan	Kadar Serum ALT (U/L)					Rerata	± SD
	1	2	3	4	5		
KNeg	52	72	67	51	69	62.20	4.08
KPos	309	178	191	177	628	296.60	86.46
KP1	121	196	212	202	221	190.40	17.87
KP3	106	79	176	117	128	121.20	15.93



Tabel 5.2 Hasil AST dari 5 Kelompok Perlakuan

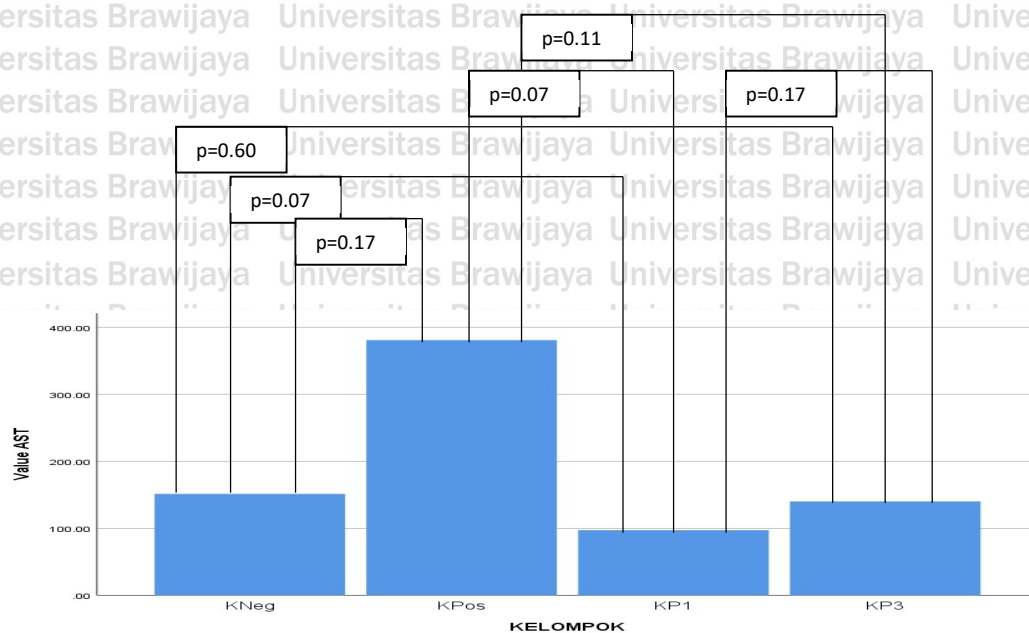
Kelompok Perlakuan	Kadar Serum AST (U/L)					Rerata	± SD
	1	2	3	4	5		
KNeg	105	143	141	140	175	140.80	6.74
KPos	381	33	426	171	894	381.00	146.70
KP1	11.4	134	106	163	72	97.28	26.23
KP2	1327	1200	2008	1200	2656	1678.20	286.84
KP3	137	114	145	144	161	140.20	7.64



Gambar 5.2 Grafik rata-rata kadar AST setiap kelompok perlakuan

Ditemukan kadar AST KP2 yang sangat tinggi dibandingkan kelompok perlakuan lain, Salah satu penyebab yang ditemukan adalah terjadinya hemolisis pada sampel darah KP2(3), KP2(4), dan KP 2(5) setelah disentrifugasi. Dengan ini penulis memutuskan untuk mengekeksklusi KP2 dari uji analisis data.

Kelompok Perlakuan	Kadar Serum AST (U/L)					Rerata	± SD
	1	2	3	4	5		
KNeg	105	143	141	140	175	140.80	6.74
KPos	381	33	426	171	894	381.00	146.70
KP1	11.4	134	106	163	72	97.28	26.23
KP3	137	114	145	144	161	140.20	7.64



5.2 Analisis Data

Analisis data menggunakan aplikasi SPSS versi 24. Hasil analisis tertera pada lampiran. Analisis data tidak penulis lakukan pada KP2 karena adanya nilai ekstrim yang selanjutnya akan penulis paparkan dalam bab pembahasan.

5.2.1 Uji Asumsi Data

Uji asumsi data berupa uji normalitas distribusi data dan uji homogenitas data perlu dilakukan sebelum melakukan uji statistik. Untuk melakukan uji parametrik, maka hasil uji asumsi data harus menunjukkan data yang terdistribusi normal dan homogen. Jika syarat ini tidak terpenuhi, maka harus dilakukan uji non-parametrik.

5.2.1.1 Uji Normalitas Data

Uji Normalitas Data menggunakan *Shapiro Wilk Test* untuk masing-masing

ALT dan AST hasil penelitian karena jumlah sampel penelitian kurang dari 50.

Dikatakan terdistribusi normal jika $p > 0.05$. Hasil penelitian ini menunjukkan

bahwa data ALT tidak terdistribusi normal karena terdapat kelompok perlakuan

dengan $p < 0.05$, yaitu KPos dan KP1. Sedangkan data AST terdistribusi normal.

Tabel 5.3 Hasil Uji Normalitas ALT dan AST

Uji Asumsi Data	P-value
Uji Normalitas ALT	
KNeg	0.110
KPos	0.021
KP1	0.049
KP3	0.799
Uji Normalitas AST	
KNeg	0.125
KPos	0.619
KP1	0.897
KP3	0.687

5.2.1.2 Uji Homogenitas Ragam Data

Uji homogenitas ragam data menggunakan *Levene Test*. Dikatakan

homogen jika $p > 0.05$. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa data ALT maupun

AST tidak homogen karena $p < 0.05$.

Tabel 5.4 Hasil Uji Homogenitas ALT dan AST

Uji Asumsi Data	P-value
Uji Homogenitas ALT	0.014
Uji Homogenitas AST	0.019

5.2.2 Uji Kruskal Wallis

Uji *Kruskal Wallis* digunakan untuk melihat signifikansi perbedaan rata-rata kadar ALT maupun AST dari seluruh kelompok perlakuan pada data yang tidak terdistribusi normal (non-parametrik). Dikatakan signifikan jika $p < 0.05$. Hasil menunjukkan bahwa perbedaan rata-rata ALT signifikan sedangkan data AST tidak signifikan.

Tabel 5.5 Hasil Uji *Kruskal Wallis* ALT dan AST

	Uji <i>Kruskal Wallis</i>	P-value
ALT		0.002
AST		0.101

5.2.3 Uji Mann Whitney U

Uji *Mann Whitney U* digunakan untuk melihat signifikansi perbedaan rata-rata antara 2 kelompok perlakuan pada kadar ALT maupun AST. Dikatakan signifikan jika $p < 0.05$.

Tabel 5.6 Hasil Uji *Mann Whitney U* ALT dan AST

ALT	KPos	KP1	KP3
KNeg	0.009	0.009	0.009
KPos		0.917	0.009
KP1			0.028

AST	KPos	KP1	KP3
KNeg	0.175	0.076	0.602
KPos		0.076	0.117
KP1			0.175

Untuk ALT, ditemukan 1 pasangan kelompok yang tidak signifikan berbeda yaitu antara KPos-KP1. Sedangkan untuk AST, ditemukan data yang tidak signifikan berbeda pada semua pasangan kelompok.

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan Hasil Penelitian

Kerusakan hepatosit dapat dipicu oleh berbagai keadaan, salah satunya akibat dari injeksi karbon tetraklorida (CCl_4). Metabolit CCl_4 yang merupakan radikal bebas penyebab destruksi membran hepatosit (Khan & Sultana, 2009). Di dalam hepatosit sendiri terdapat enzim-enzim seperti ALT (pada sitoplasma) dan AST (pada sitoplasma dan mitokondria). Destruksi membran hepatosit dengan peningkatan permeabilitas menyebabkan pelepasan dari ALT dan AST ke dalam peredaran darah sehingga terjadi peningkatan kadarnya ketika dilakukan pemeriksaan (Woreta & Alqahtani, 2014).

Mengacu pada grafik 5.1 dan *uji Mann Whitney U*, terlihat bahwa rata-rata kadar ALT KPos secara signifikan ($p=0.009$) lebih tinggi dibandingkan KNeg, membuktikan bahwa injeksi kronis dari CCl_4 menyebabkan pelepasan ALT ke dalam sirkulasi meningkat. Hal ini sesuai dengan beberapa penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa metabolisme CCl_4 pada hati memproduksi radikal bebas (Sancheti et al., 2013), dan memicu stres oksidatif. Stres oksidatif selanjutnya akan menginisiasi produksi dari sitokin-sitokin inflamasi yang merusak membran hepatosit (Heeba and Morsy, 2015). Kerusakan membran hepatosit dengan peningkatan permeabilitas menyebabkan pelepasan dari ALT ke dalam peredaran darah (Woreta & Alqahtani, 2014). Rata-rata kadar ALT KP1 lebih rendah dari KPos ($p=0.917$) namun lebih tinggi dari KNeg ($p=0.09$), menunjukkan pengaruh ekstrak daun *Moringa oleifera* (MO) 150 mg/kgBB dapat menurunkan pelepasan ALT ke sirkulasi walaupun dalam jumlah yang tidak signifikan dibandingkan

kelompok tikus tanpa pemberian ekstrak MO. Penangkalan radikal-radikal bebas dari metabolisme CCl_4 merupakan mekanisme antioksidan dari MO (El-bakry *et al.*, 2016) yang akhirnya mengurangi kerusakan membran hepatosit. Rata-rata kadar ALT KP3 lebih rendah dari KPos ($p=0.009$) dan KP1 (0.028) secara signifikan namun tidak lebih rendah dari KNeg ($p=0.009$). Hal ini menunjukkan dosis 600 mg/kgBB pada KP3 memiliki pengaruh yang lebih besar dalam menurunkan pelepasan ALT ke dalam sirkulasi dibandingkan dengan dosis 150 mg/kgBB walaupun tetap tidak dapat mencegah sama sekali kerusakan hepatosit sebaik tanpa injeksi kronis CCl_4 .

Mengacu pada grafik 5.2 dan uji *Mann Whitney U*, terlihat bahwa rata-rata kadar AST KPos secara tidak signifikan lebih tinggi dibandingkan KNeg ($p=0.175$) yang dalam hal ini diharapkan dapat menunjukkan pengaruh pemberian CCl_4 terhadap kerusakan hepatosit. Rata-rata kadar AST KP1 lebih rendah secara tidak signifikan terhadap KPos ($p=0.076$), KNeg ($p=0.076$) dan KP3 ($p=0.175$). Rata-rata kadar KP3 lebih rendah secara tidak signifikan terhadap KPos ($p=0.117$) dan KNeg ($p=0.602$). Perlu diperhatikan kembali bahwa AST dapat saja tidak menunjukkan nilai yang signifikan terhadap kerusakan hepatosit, baik lebih tinggi maupun lebih rendah dibanding kelompok lainnya, karena AST juga dipengaruhi oleh lokasinya di tempat selain hepatosit dengan mekanisme yang mungkin saja berbeda responnya terhadap pemberian CCl_4 & ekstrak MO dan tidak diteliti dalam penelitian ini. Jamjute *et al.* tahun 2009, dalam penelitiannya menyatakan bahwa AST terdapat dalam sitosol dan mitokondria pada organ hati, otot jantung, ginjal, otak, pankreas, paru-paru, leukosit, dan eritrosit. Hal ini menyebabkan AST menjadi kurang sensitif dan spesifik untuk kerusakan hepatosit di organ hati.

Selain itu, Atta *et al.* tahun 2017, juga menyatakan bahwa penurunan kadar ALT

lebih spesifik dibandingkan penurunan kadar AST pada pemberian ekstrak *Moringa oleifera*. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak *Moringa oleifera* lebih spesifik berpengaruh terhadap hepatosit yang menjadi sumber utama ALT.

Pada data hasil penelitian, kelompok KP2 memiliki kadar ALT dan AST yang sangat meningkat dibandingkan kelompok lainnya dalam rentang yang tidak wajar sehingga KP2 tidak dimasukkan dalam analisis statistik. Dalam hal ini tidak wajar mengandung pengertian bahwa KP2 memiliki kadar ALT dan AST yang lebih tinggi dibandingkan KP1 dengan dosis MO yang lebih rendah (150 mg/kgBB) dan juga lebih tinggi dibandingkan KP3 dengan dosis MO yang lebih tinggi (600 mg/kgBB).

Penelitian ini sudah melakukan tindakan untuk menjamin keseragaman perawatan (kandang, pemberian makan & minum, rentang waktu perlakuan), pemberian CCl₄ berdasarkan berat badan tikus, serta dosis MO berbeda yang akan dievaluasi pengaruhnya. Dalam hal ini, terdapat faktor yang berpengaruh terhadap kadar ALT dan AST KP2 namun tidak dapat dikendalikan dalam penelitian ini.

Pada penelitian ini, ditemukan hemolisis pada KP2(3), KP2(4), KP2(5). Hemolisis didefinisikan sebagai rupturnya eritrosit dan menyebabkan bercampurnya komponen intraseluler eritrosit ke dalam plasma atau serum (Heireman, 2017). Hemolisis dapat disebabkan oleh *tube* transpor pneumatik ataupun pemindahan darah dari *sputtt* ke dalam *tube* transpor yang terlalu cepat.

Hemolisis dapat mempengaruhi hasil pemeriksaan beberapa analit seperti ALT, AST, *lactate dehydrogenase*, *creatine kinase-MB*, potasium (Green, 2013).

Selain itu, untuk KP2(1) dan KP2(2) yang tidak mengalami hemolisis namun juga mengalami peningkatan kadar ALT dan AST penulis mencoba mencari beberapa hal yang menjadi faktor risiko, namun bukan penyebab pasti, yang berpengaruh terhadap hasil penelitian secara umum (Piyophipapong *et al.*, 2017)

1. Fase pre-analitik

- Melibatkan semua proses yang terjadi sebelum sampel penelitian diukur
- Memberi pengaruh 68.2% pada ketidaksesuaian hasil penelitian
- Faktor yang ada diantaranya variabel terkait tikus (jenis kelamin, usia, diet, stress), pengambilan spesimen (teknik pengambilan darah, volume darah, tipe antikoagulan), pengantaran spesimen, pemrosesan dan penyimpanan spesimen. Interferens endogen yang banyak terjadi meliputi hemolisis, lipidemia, bilirubinemia, dan paraproteinemia.

2. Fase analitik

- Melibatkan metode dan instrumen yang digunakan untuk mengukur analit dalam spesimen
- Memberi pengaruh 13.3% pada ketidaksesuaian hasil penelitian
- Saat ini kebanyakan dilakukan dengan sistem otomatis teknologi sehingga meminimalisir ketidaksesuaian hasil.

3. Fase post-analitik

- Melibatkan proses pelaporan dan interpretasi hasil laboratorium
- Memberi pengaruh 18.5% pada ketidaksesuaian hasil penelitian

6.2 Keterbatasan Penelitian

Setelah diketahui bahwa sampel KP2 memiliki kadar ALT dan AST yang layak untuk dilakukan percobaan kembali karena memiliki kecenderungan yang berbeda, tidak terdapat cadangan darah dari tikus yang telah dibedah.

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

1. Pemberian ekstrak daun *Moringa oleifera* (MO) berpengaruh terhadap penurunan kadar alanine aminotransferase (ALT) pada tikus model fibrosis hati akibat injeksi kronis karbon tetraklorida (CCl₄).
2. Pemberian ekstrak daun *Moringa oleifera* (MO) tidak berpengaruh secara signifikan terhadap penurunan kadar aspartate aminotransferase (AST) pada tikus model fibrosis hati akibat injeksi kronis karbon tetraklorida (CCl₄).

7.2 Saran

1. Penulis menyarankan untuk dilakukannya penelitian lebih lanjut mengenai profil dan karakteristik *alanin aminotransferase* (ALT) dan *aspartate aminotransferase* (AST) sehingga perlakuan sampel selama penelitian yang mempengaruhi kadar ALT dan AST dapat dikendalikan.
2. Penulis menyarankan untuk dilakukannya penelitian lebih lanjut mengenai faktor intrinsik (tingkat stres pada tikus, variasi genetik tikus, volume darah tikus, dll) dan ekstrinsik (teknik pengambilan sampel, proses pengantaran sampel, paparan suhu, dll) yang dapat mempengaruhi hasil penelitian pada penggunaan ekstrak daun *Moringa oleifera* (MO), karbon tetraklorida (CCl₄), dan hewan coba *Rattus norvegicus*.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahsan, M. R., Islam, K. M., Bulbul, I. J., Musaddik, M. A., & Haque, E. 2009. *Hepatoprotective activity of methanol extract of some medicinal plants against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats*. Eur J Sci Res., 37(2), 302-310.
- Aja, P. M., Nwachukwu, N., Ibiam, U. A., Igwenyi, I. O., Offor, C. E., & Orji, U. O. 2014. *Chemical constituents of Moringa oleifera leaves and seeds from Abakaliki, Nigeria*. American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics, 2(3), 310-321.
- Amaglo, N.K., Bennett, R.N., Lo Curto, R.B., Rosa, E.A.S., Lo Turco, V., Giuffrida, A., Lo Curto, A., Crea, F., Timpo, G.M. 2010. *Profiling selected phytochemicals and nutrients in different tissues of the multipurpose tree Moringa oleifera L., grown in Ghana*. Food Chem., 122, 1047–1054.
- Asiedu-Gyekye, I. J., Frimpong-Manso, S. A. M. U. E. L., Awortwe, C., Antwi, D. A., & Nyarko, A. K. 2014. *Micro-and macroelemental composition and safety evaluation of the nutraceutical Moringa oleifera leaves*. Journal of toxicology.
- Atta, A. H., Soufy, H., Nasr, S. M., Soliman, A. M., Nassar, S. A., Al Maweri, A., & Abdalla, H. M. D. A. M. 2017. *Hepatoprotective and antioxidant effects of methanol extract of Moringa oleifera leaves in rats*. Wulfenia Journal, 24(3), 249-268.
- Augustin, J.M., Kuzina, V., Andersen, S.B., Bak, S. 2011. *Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins*. Phytochemistry, 72, 435–457.
- Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. 2014. *Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal*. Oxidative medicine and cellular longevity.
- Bhatta, R., Saravanan, M., Baruah, L., Sampath, K.T. 2012. *Nutrient content, in vitro ruminal fermentation characteristics and methane reduction potential of tropical tannin-containing leaves*. J. Sci. Food Agric., 92, 2929–2935.
- Borel, P., Preveraud, D., Desmarchelier, C. 2013. *Bioavailability of vitamin E in humans: An update*. Nutr. Rev, 71, 319–331.
- Buday, B., Pach, P. F., Literati-Nagy, B., Vitai, M., Kovacs, G., Vecsei, Z., Lengyel, C. 2015. *Sex influenced association of directly measured insulin sensitivity and serum transaminase levels: Why alanine aminotransferase only predicts cardiovascular risk in men?*. Cardiovascular diabetology, 14(1), 55.

Byass, P. 2014. *The global burden of liver disease: a challenge for methods and for public health*. BMC Medicine, 12(1):159.

Chambial, S., Dwivedi, S., Shukla, K.K., John, P.J., Sharma, P. 2013. *Vitamin C in disease prevention and cure: An overview*. Indian J. Clin. Biochem., 28, 314–328.

Coppin, J.P., Xu, Y., Chen, H., Pan, M.H., Ho, C.T., Juliani, R., Simon, J.E., Wu, Q. 2013. *Determination of flavonoids by LC/MS and anti-inflammatory activity in Moringa oleifera*. J. Funct. Foods, 5, 1892–1899.

Cushnie, T.P.T., Cushnie, B., Lamb, A.J. 2014. *Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities*. Int. J. Antimicrob. Agents, 44, 377–386.

Domenicali, M., Caraceni, P., Giannone, F., et al. 2009. *A novel model of CCl₄-induced cirrhosis with ascites in the mouse*. J Hepatol, 51(6):991–999

Dong, S., Chen, Q. L., Song, Y. N., Sun, Y., Wei, B., Li, X. Y., & Su, S. B. 2016. *Mechanisms of CCl₄-induced liver fibrosis with combined transcriptomic and proteomic analysis*. The Journal of toxicological sciences, 41(4), 561-572.

Dunning, S., ur Rehman, A., Tiebosch, M. H., Hannivoort, R. A., Haijer, F. W., Woudenberg, J., & Moshage, H. 2013. *Glutathione and antioxidant enzymes serve complementary roles in protecting activated hepatic stellate cells against hydrogen peroxide-induced cell death*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 1832(12), 2027-2034.

Duval, F., Moreno-Cuevas, J.E., González-Garza, M.T., Rodríguez-Montalvo, C. and Cruz-Vega, D.E. 2014. *Protective mechanisms of medicinal plants targeting hepatic stellate cell activation and extracellular matrix deposition in liver fibrosis*. Chin. Med., 9, 27.

El-bakry, K., Toson, E. S., Serag, M., & Aboser, M. 2016. *Hepatoprotective effect of Moringa oleifera leaves extract against carbon tetrachloride-induced liver damage in rats*. World journal of pharmaceutical research, 5(5), 76-89.

Forster, N., Ulrichs, C., Schreiner, M., Muller, C.T., Mewis, I. 2015. *Development of a reliable extraction and quantification method for glucosinolates in Moringa oleifera*. Food Chem., 166, 456–464.

Franklin, H., Mitchell MC. 2012. *Laboratory tests*. In: Maddrey WC, Schiff ER, Sorrell MF, editors. *Schiff's diseases of the liver*. Wiley-Blackwell p. 17–43.

Ganatra, T. H., Joshi, U. H., Bhalodia, P., Desai, T., Tigar, P. 2012. *A panoramic view on pharmacognostic, pharmacological, nutritional, therapeutic and prophylactic values of Moringa oleifera Lam*. Int Res J Pharm, 3(6), 1-7.

Gopalakrishnan, L., Doriya, K., Kumar, D. S. 2016. *Moringa oleifera: A review on nutritive importance and its medicinal application*. Food Science and Human Wellness, 5(2), 49-56.

- Green, S. F. 2013. *The cost of poor blood specimen quality and errors in preanalytical processes. Clinical biochemistry*, 46(13-14), 1175-1179.
- Guo, C., Xu, L., He, Q., Liang, T., Duan, X., Li, R. 2013. *Anti-fibrotic effects of puerarin on CCl₄-induced hepatic fibrosis in rats possibly through the regulation of PPAR- γ expression and inhibition of PI3K/Akt pathway. Food Chem. Toxicol.*, 56, 436-442.
- Heeba, G.H. and Mahmoud, M.E. 2014. *Therapeutic potential of morin against liver fibrosis in rats: modulation of oxidative stress, cytokine production and nuclear factor kappa B. Environ Toxicol. Pharmacol.*, 37, 662-671.
- Heeba, G.H. and Morsy, M.A. 2015. *Fucoidan ameliorates steatohepatitis and insulin resistance by suppressing oxidative stress and inflammatory cytokines in experimental non-alcoholic fatty liver disease. Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 40, 907-914.
- Heireman, L., Van Geel, P., Musger, L., Heylen, E., Uyttenbroeck, W., & Mahieu, B. 2017. *Causes, consequences and management of sample hemolysis in the clinical laboratory. Clinical biochemistry*, 50(18), 1317-1322.
- Herlong, F. and Mitchell, C. 2012. *Laboratory tests*. In: Maddrey WC, Schiff ER, Sorrell MF, editors. *Schiff's diseases of the liver*. Wiley-Blackwell, 17-43.
- Jamjute, P., Ahmad, A., Ghosh, T., & Banfield, P. 2009. *Liver function test and pregnancy. The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 22(3), 274-283. doi:10.1080/14767050802211929
- Joshi, P. and Mehta, D. 2010. *Effect of dehydration on the nutritive value of drumstick leaves. J. Metabolomics Syst. Biol.*, 1, 5-9.
- Kancheva, V.D. and Kasaikina, O.T. 2013. *Bio-antioxidants-a chemical base of their antioxidant activity and beneficial effect on human health. Curr. Med. Chem.*, 20, 4784-805.
- Karthivashan, G., Tangestani, FM., Arulselvan, P., Abas, F., Fakurazi, S. 2013. *Identification of bioactive candidate compounds responsible for oxidative challenge from hydroethanolic extract of Moringa oleifera leaves. Journal of Food Science*, 78(9): 1368-1375.
- Kasolo, J.N., Bimenya, G.S., Ojok, L., Ochieng, J., Ogwal-Okeng, J.W. 2010. *Phytochemicals and uses of Moringa oleifera leaves in Ugandan rural communities. J. Med. Plant Res.*, 4, 753-757.
- Khalaf, A. A. A., Mekawy, M. E. M., Moawad, M. S., & Ahmed, A. M. 2009. *Comparative study on the protective effect of some antioxidants against CCl₄ hepatotoxicity in rats. Egyptian Journal of Natural Toxins*, 6(1), 59-82.

- Khan, T. H., Sultana, S. 2009. *Antioxidant and hepatoprotective potential of Aegle marmelos Correa against CCl₄-induced oxidative stress and early tumor events*. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 24(2), 320–327. doi:10.1080/14756360802167754
- Kim, S. H., Cheon, H. J., Yun, N., Oh, S. T., Shin, E., Shim, K. S., & Lee, S. M. 2009. *Protective effect of a mixture of Aloe vera and Silybum marianum against carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity and liver fibrosis*. Journal of pharmacological sciences, 109(1), 119-127.
- Kumar, S., Pandey, A.K. 2013. *Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview*. Sci. World J., 2013, 162750.
- Leone, A., Spada, A., Battezzati, A., Schiraldi, A., Aristil, J., Bertoli, S. 2015. *Cultivation, genetic, ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of Moringa oleifera leaves: an overview*. International journal of molecular sciences, 16(6), 12791-12835.
- Li, S., Tan, H.Y., Wang, N., Zhang, Z.J., Lao, L., Wong, C.W., Feng, Y. 2015. *The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases*. Int. J. Mol. Sci., 16, 26087-26124.
- Liu, T., Wang, X., Karsdal, M. A., Leeming, D. J., Genovese, F. 2012. *Molecular Serum Markers of Liver Fibrosis*. Biomarker Insights, 7, BMI.S10009. doi:10.4137/bmi.s10009
- Longo, D.L. et al., 2010. *Harrison's gastroenterology and hepatology*. McGraw-Hill Medical, New York:738.
- Mallat, A., Lotersztajn, S. 2013. *Cellular Mechanisms of Tissue Fibrosis*. 5. Novel insights into liver fibrosis. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 305(8), C789–C799. doi:10.1152/ajpcell.00230.
- Moyo, B., Masika, P.J., Hugo, A., Muchenje, V. 2011. *Nutritional characterization of Moringa (Moringa oleifera Lam.) leaves*. Afr. J. Biotechnol., 10, 12925–12933.
- Mukherjee, S., Gollan, J.L. 2011. *Assessment of liver function*. in: A.S. Lok, J.S. Dooley, A.K. Burroughs et al, (Eds.) *Sherlock's diseases of the liver and biliary system*. Wiley-Blackwell, 20–35.
- Nouman, W., Basra, S.M.A., Siddiqui, M.T., Yasmeen, A., Gull, T., Alcayde, M.A.C. 2014. *Potential of Moringa oleifera L. as livestock fodder crop: A review*. Turk. J. Agric. For., 38, 114.
- Piyophiprapong, S., Wongtiraoporn, W., & Sribhen, K. 2017. *Factitious results in clinical chemistry tests caused by common endogenous interferents*. Siriraj Medical Journal, 62(4), 185-188.

- Popoola, J.O., Obembe, O.O. 2013. *Local knowledge, use pattern and geographical distribution of Moringa oleifera Lam. (Moringaceae) in Nigeria*. J. Ethnopharmacol., 150, 682–691.
- Ranjan, R., Swamp, D., Patra, C. R., Vikas, C. 2009. *Tamarindus indica L. and Moringa oleifera extracts administration ameliorates fluoride toxicity in rabbits*. Indian Journal of Experimental Biology, 49:900-905.
- Roloff, A., Weisgerber, H., Lang, U., Stimm, B. 2009. *Moringa oleifera LAM.*, 1785. Sea, 10(10).
- Sahakitpichan, P., Mahidol, C., Disadee, W., Ruchirawat, S., Kanchanapoom, T. 2011. *Unusual glycosides of pyrrole alkaloid and 4'-hydroxyphenylethanamide from leaves of Moringa oleifera*. Phytochemistry, 72, 791–795.
- Sancheti, S., Sancheti, S., & Seo, S. Y. 2013. *Ameliorative effects of 7-methylcoumarin and 7-methoxycoumarin against CCl₄-induced hepatotoxicity in rats*. Drug and chemical toxicology, 36(1), 42-47.
- Scholten, D., Trebicka, J., Liedtke, C., et al. 2015. *The carbon tetrachloride model in mice*. Lab Anim 49(S1):4–11
- Singh, B.N., Singh, B.R., Singh, R.L., Prakash, D., Dhakarey, R., Upadhyay, G., Singh, H.B. 2009. *Oxidative DNA damage protective activity, antioxidant and anti-quorum sensing potentials of Moringa oleifera*. Food Chem. Toxicol., 47, 1109–1116.
- Sreelatha, S., Padma, P. R. 2009. *Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Moringa oleifera Leaves in Two Stages of Maturity*. Plant Foods for Human Nutrition, 64(4), 303–311. doi:10.1007/s11130-009-0141-0
- Sreelatha, S., Padma, P. R. 2010. *Protective Mechanisms of Moringa oleifera against CCl₄-Induced Oxidative Stress in Precision-Cut Liver Slices*. Forschende Komplementärmedizin / Research in Complementary Medicine, 17(4), 189–194. doi:10.1159/000318606
- Sreelatha, S., Padma, P.R. 2009. *Antioxidant activity and total phenolic content of Moringa oleifera leaves in two stages of maturity*. Plant Foods Hum. Nutr., 64, 303–311.
- Sultana, B., Anwar, F., Ashraf, M. 2009. *Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts*. Molecules, 14, 2167–2180.
- Teixeira, E.M.B., Carvalho, M.R.B., Neves, V.A., Silva, M.A., Arantes-Pereira, L. 2014. *Chemical characteristics and fractionation of proteins from Moringa oleifera Lam. leaves*. Food Chem., 147, 51–54.
- Tian, X., Tang, H., Lin, H., Cheng, G., Wang, S., Zhang, X. 2013. *Saponins: The potential chemotherapeutic agents in pursuing new anti-glioblastoma drugs*. Mini Rev Med Chem., 13, 1709–1724.

Tsujimura, K., Ichinose, F., Hara, T., et al. 2008. *The inhalation exposure of carbon tetrachloride promote rat liver carcinogenesis in a medium-term liver bioassay*. Toxicol Lett 176(3):207–214

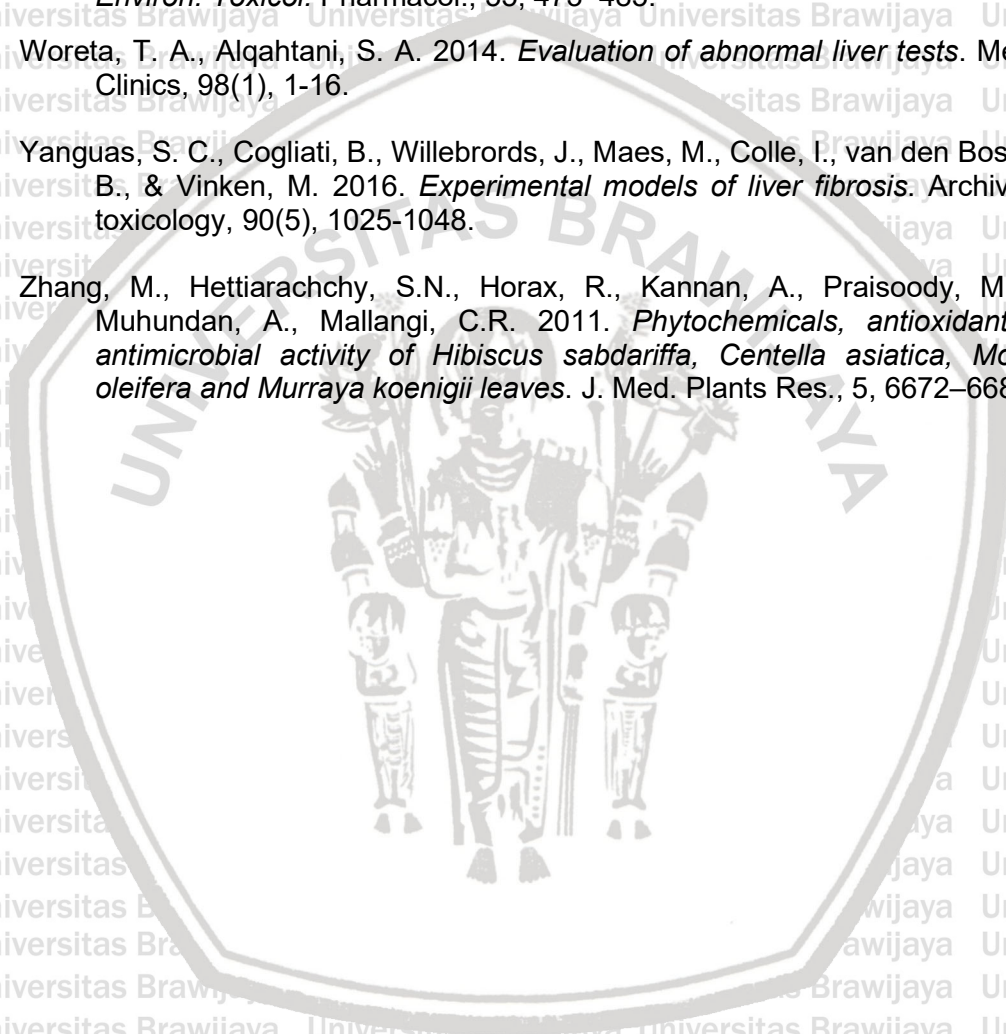
Verma, A. R., Vijayakumar, M., Mathela, C. S., Rao, C. V. 2009. *In vitro and in vivo antioxidant properties of different fractions of Moringa oleifera leaves*. Food and Chemical Toxicology, 47(9), 2196-2201.

Verma, S., Singh, A., Mishra, A. 2013. *Gallic acid: Molecular rival of cancer*. Environ. Toxicol. Pharmacol., 35, 473–485.

Woreta, T. A., Alqahtani, S. A. 2014. *Evaluation of abnormal liver tests*. Medical Clinics, 98(1), 1-16.

Yanguas, S. C., Cogliati, B., Willebrords, J., Maes, M., Colle, I., van den Bossche, B., & Vinken, M. 2016. *Experimental models of liver fibrosis*. Archives of toxicology, 90(5), 1025-1048.

Zhang, M., Hettiarachchy, S.N., Horax, R., Kannan, A., Praisoody, M.D.A., Muhundan, A., Mallangi, C.R. 2011. *Phytochemicals, antioxidant and antimicrobial activity of Hibiscus sabdariffa, Centella asiatica, Moringa oleifera and Murraya koenigii leaves*. J. Med. Plants Res., 5, 6672–6680.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Pelaksanaan Penelitian



Kandang-kandang tikus



Tikus di dalam kandang



Menyonde ekstrak daun *Moringa oleifera*



Botol penyimpanan ekstrak daun *Moringa oleifera* dan CCl₄



Pembedahan



Lampiran 2. Uji Normalitas dan Uji Homogenitas

Uji Normalitas ALT dengan *Shapiro-Wilk Test*

Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	kelompok	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
ALT	KNeg	.317	5	.111	.816	5	.110
	KPos	.308	5	.138	.734	5	.021
	KP1	.356	5	.038	.775	5	.049
	KP3	.224	5	.200*	.959	5	.799

Uji Normalitas AST dengan *Shapiro-Wilk Test*

Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	kelompok	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
AST	KNeg	.311	5	.128	.824	5	.125
	KPos	.245	5	.200*	.933	5	.619
	KP1	.159	5	.200*	.973	5	.897
	KP3	.226	5	.200*	.943	5	.687

Uji Homogenitas ALT dengan *Levene Test*

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
ALT	Based on Mean	4.787	3	16	.014
	Based on Median	1.393	3	16	.281
	Based on Median and with adjusted df	1.393	3	4.406	.358
	Based on trimmed mean	4.326	3	16	.021

Uji Homogenitas AST dengan *Levene Test*

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
AST	Based on Mean	4.425	3	16	.019
	Based on Median	4.438	3	16	.019
	Based on Median and with adjusted df	4.438	3	4.283	.085
	Based on trimmed mean	4.598	3	16	.017



Lampiran 3. Uji Kruskal Wallis

Uji Kruskal Wallis ALT

Test Statistics^{a,b}

	ALT
Kruskal-Wallis H	15.274
df	3
Asymp. Sig.	.002

Uji Kruskal Wallis AST

Test Statistics^{a,b}

	AST
Kruskal-Wallis H	6.234
df	3
Asymp. Sig.	.101

Lampiran 4. Uji Mann Whitney U

Uji Mann Whitney U ALT

KNeg dan KPos

Test Statistics^a

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

KNeg dan KP1

Test Statistics^a

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



KNeg dan KP3

Test Statistics^a

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

KPos dan KP3

Test Statistics^a

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

Uji Mann Whitney U AST

KNeg dan KPos

Test Statistics^a

	AST
Mann-Whitney U	6.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-1.358
Asymp. Sig. (2-tailed)	.175
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.222 ^b

KPos dan KP1

Test Statistics^a

	ALT
Mann-Whitney U	12.000
Wilcoxon W	27.000
Z	-.104
Asymp. Sig. (2-tailed)	.917
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^b

KP1 dan KP3

Test Statistics^a

	ALT
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	17.000
Z	-2.193
Asymp. Sig. (2-tailed)	.028
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.032 ^b

KNeg dan KP1

Test Statistics^a

	AST
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	19.000
Z	-1.776
Asymp. Sig. (2-tailed)	.076
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.095 ^b

KNeg dan KP3

Test Statistics^a

	AST
Mann-Whitney U	10.000
Wilcoxon W	25.000
Z	-.522
Asymp. Sig. (2-tailed)	.602
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.690 ^b

KPos dan KP3

Test Statistics^a

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

KP1 dan KP3

Test Statistics^a

	AST
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	19.000
Z	-1.776
Asymp. Sig. (2-tailed)	.076
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.095 ^b

KP1 dan KP3

Test Statistics^a

	AST
Mann-Whitney U	6.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-1.358
Asymp. Sig. (2-tailed)	.175
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.222 ^b

Lampiran 5. Keterangan Kelaikan Etik



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN

Jalan Veteran Malang - 65145, Jawa Timur - Indonesia
 Telp. (0341) 555617 Fax. 558117; 561187 - Tlx. (0341) 564755
 http://www.brawijaya.ac.id e-mail : kep.fk@ub.ac.id

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")

No. 153A / EC / KEPK / 06 / 2018

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA, SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN:

JUDUL : Potensi Ekstrak Etanol Daun *Moringa oleifera* Lamk. dalam Menghambat Progresivitas Fibrosis Hati dan Studi Efek Sampingnya terhadap Penurunan Fungsi Ginjal pada Tikus Model Fibrosis Hati.

PENELITI UTAMA : dr. Supriono, Sp.PD-KGEH

ANGGOTA :

1. dr. Yeni Larasati	9. dr. Amanda Cininta Wowor	17. Florencia Candra M
2. dr. Nadia Zerlinda Mustamsir	10. dr. Fikri Baladraf	18. Muhammad Irfan D
3. dr. Rifai Renaldi	11. dr. Ponda Ernest Hadinata	19. Zalfa Daulah
4. dr. Edy Susanto	12. Febryana Nur Safitri, S.Ked	20. Azkiya Zahra
5. dr. Rahmanto Adi	13. Lestari Kanti Wilujeng, S.Ked	21. Zuke Ulva Diana
6. dr. Safarina Kharima Laitupa	14. Mokhammad Fahmi Rizki S	22. Alya Safira
7. dr. Ayu Cahya Andheyani	15. Kartika Widyasari	23. Yunita Lestari I
8. dr. Ade Rahmawati	16. Muthi'ah Adira Juwono	24. Ruth Ciarita Pradibdo
		25. Dohani Olivia N

UNIT / LEMBAGA : Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

TEMPAT PENELITIAN : Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

DINYATAKAN LAIK ETIK.



Prof. Dr.-dr. Moch. Istiadid ES, SpS, SpBS(K), SH, M.Hum, Dr.H.
 NIK. 160746885

Catatan :
 Keterangan Laik Etik Ini Berlaku 1 (Satu) Tahun Sejak Tanggal Dikeluarkan
 Pada Akhir Penelitian, Laporan Pelaksanaan Penelitian Harus Diserahkan Kepada KEPK-FKUB Dalam Bentuk Soft Copy. Jika Ada Perubahan Protokol Dan / Atau Perpanjangan Penelitian, Harus Mengajukan Kembali Permohonan Kajian Etik Penelitian (Amendemen Protokol)