

**PENGARUH EKSTRAK DAUN KELOR (*Moringa oleifera* Lam.)  
TERHADAP KADAR INTERLEUKIN-1 BETA (IL-1 $\beta$ ) DAN  
GAMBARAN HISTOPATOLOGI PULAU LANGERHANS  
PANKREAS PADA *Rattus norvegicus* STRAIN WISTAR  
DENGAN PERLAKUAN DIET ATEROGENIK**

**SKRIPSI**

**OLEH :**  
**LING SANDRA ARYASTYANI HAJAR AL KAHFI**  
**0911313027**



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

**PENGARUH EKSTRAK DAUN KELOR (*Moringa oleifera* Lam.)  
TERHADAP KADAR INTERLEUKIN-1 BETA (IL-1 $\beta$ ) DAN  
GAMBARAN HISTOPATOLOGI PULAU LANGERHANS  
PANKREAS PADA *Rattus norvegicus* STRAIN WISTAR  
DENGAN PERLAKUAN DIET ATEROGENIK**

**SKRIPSI**

**OLEH :  
LING SANDRA ARYASTYANI HAJAR AL KAHFI  
0911313027**



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

**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**

**Pengaruh Ekstrak Air daun kelor (*Moringa oleifera Lam*) terhadap Kadar Interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) dan Gambaran Histopatologi pulau Langerhans pankreas *Rattus norvegicus* strain Wistar dengan perlakuan Diet Aterogenik**

Oleh :  
**LING SANDRA ARYASTYANI HAJAR AL KAHFI**  
**0911313027**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
pada tanggal 2 September 2013  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing 1

Pembimbing 2

**Dr. Sri Murwani, drh., MP**  
NIP. 19630101 198903 2 001

**Prof. Dr. Pratiwi Trisunuwati, drh., MS**  
NIP. 19480615 197702 2 001

Mengetahui,  
Ketua Program Kedokteran Hewan Universitas  
Brawijaya

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

**Prof. Pratiwi Trisunuwati, drh., MS**  
NIP. 19480615 197702 2 001

**Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES**  
NIP. 19600903 1898802 2 001

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : LING SANDRA ARYASTYANI HAJAR AL KAHFI  
NIM : 0911313027  
Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan  
Penulis Skripsi berjudul : Pengaruh Ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) terhadap Kadar Interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) dan Gambaran Histopatologi pulau Langerhans pankreas *Rattus norvegicus* strain Wistar dengan perlakuan Diet Aterogenik

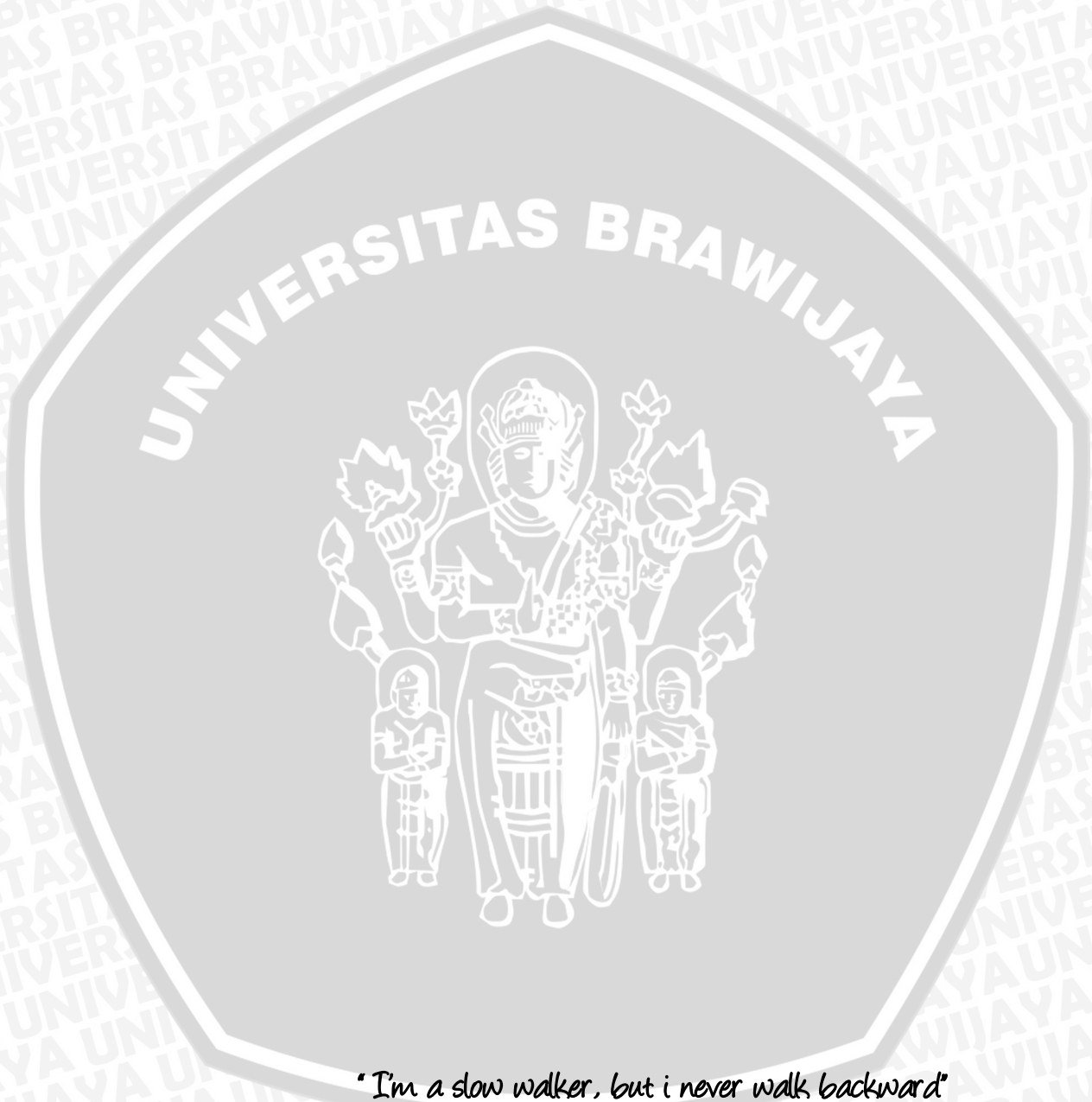
Dengan ini menyatakan bahwa:

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 9 September 2013  
Yang menyatakan,

( LING SANDRA A.H.A.K )  
NIM. 0911313027



*"I'm a slow walker, but i never walk backward"*  
Abraham Lincoln



Pengaruh Ekstrak Air *Moringa oleifera* Lam. terhadap Kadar Interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) dan Gambaran Histopatologi pulau Langerhans pankreas *Rattus norvegicus* strain Wistar dengan perlakuan diet aterogenik.

### ABSTRAK

Diet aterogenik memicu terjadinya inflamasi vaskuler yang ditandai dengan peningkatan sitokin proinflamasi interleukin-1 $\beta$  sebagai indikator terjadinya aterosklerosis. Keadaan ini memicu terjadinya gangguan resistensi insulin. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui efek dari ekstrak air *M. oleifera* sebagai anti aterosklerosis terhadap kadar sitokin inflamasi interleukin 1- $\beta$  dan kerusakan dari pulau Langerhans pada *Rattus norvegicus*. Diet aterogenik diberikan sebanyak 27 gram setiap hari selama 8 minggu. Penelitian merupakan eksperimental murni *Post Test Control Group Design*. Tikus dibagi dalam 5 kelompok dengan metode rancangan acak lengkap yaitu kelompok K1 (kontrol negatif) diberi pakan normal, kelompok K2 (kontrol positif) diberi diet aterogenik dan kelompok K3, K4, K5 diberi diet aterogenik dan ekstrak *M. oleifera*. dengan dosis 0,034 ml (K3), 0,06 ml (K4) dan 0,115 ml (K5), ekstrak diberikan per oral menggunakan sonde lambung bersama dengan pemberian diet aterogenik selama 8 minggu. Kadar IL-1 $\beta$  dianalisa menggunakan metode statistik *oneway* ANOVA, dan gambaran kerusakan pulau Langerhans pankreas dianalisa secara deskriptif. Hasil analisa statistika menunjukkan kadar IL-1 $\beta$  antara kelompok K2 (kontrol positif) dengan K5 (*M.oleifera* 0,115 ml) berbeda bermakna ( $p < 0,05$ ). Gambaran histopatologi ekstrak *M. oleifera* dapat mengurangi derajat kerusakan degenerasi sel (perubahan struktur dan ukuran) pulau Langerhans pankreas *R. norvegicus* pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kontrol positif. Kesimpulannya ekstrak *M. oleifera* Lam. dapat menurunkan kadar IL-1 $\beta$  dan mengurangi derajat kerusakan degenerasi sel pulau Langerhans *Rattus norvegicus* dengan perlakuan diet aterogenik.

Kata kunci : Aterosklerosis, Daun kelor, sitokin proinflamasi, histopatologi, diet aterogenik

Effect of *Moringa oleifera Lam.* Extract into levels of Interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) and Histopathology of pancreatic Islet Langerhans in *Rattus norvegicus* Wistar, challenge with atherogenic diet.

### ABSTRACT

Atherogenic diet triggers vascular inflammation characterized by increasing of proinflammatory cytokines interleukin-1 $\beta$  as an indicator of atherosclerosis. This situation induce insulin resistance. The purpose of this study to determine the effects of water extracts *M. oleifera* as an anti-atherosclerosis on levels of inflammatory cytokines interleukin 1- $\beta$  and the damage of the islets of Langerhans in *Rattus norvegicus*. Atherogenic diet was given as much as 27 grams per day for 8 weeks. This Research was true experimental Post Test Control Group Design. Rats were divided into 5 groups with completely randomized design methods that group K1 (negative control) were fed normal diet, K2 (positive control) were given atherogenic diet and group K3, K4, K5 given atherogenic diet and extract *M. oleifera*. doses of *Moringa oleifera Lam* extract 0.034 ml (K3), 0.06 ml (K4) and 0,115 ml (K5), extract administered orally using a stomach sonde along with giving atherogenic diet for 8 weeks. IL-1 $\beta$  levels were analyzed using oneway ANOVA statistical methods, and an overview of damage pancreatic islets of Langerhans were analyzed descriptively. Results of statistical analysis showed levels of IL-1 $\beta$  between groups K2 (positive control) with K5 (*M.oleifera* 0,115 ml) was significantly different ( $p < 0,05$ ). Histopathological images showed decrease the degree of cells degeneration pancreatic islets of Langerhans *R. norvegicus* in the treatment group compared with the positive control. In conclusion extract *Moringa oleifera Lam.* can reduce levels of IL-1 $\beta$  and reduce the degree of structural damage and cell degeneration the islets of Langerhans of *Rattus norvegicus* fed with atherogenic diet.

Keyword : Atherosclerosis, *Moringa oleifera Lam.*, proinflammatory cytokines, histopathology, atherogenic diet

## KATA PENGANTAR

Segala puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan tercinta Allah SWT, atas berkah-Nya, penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi dengan judul **“Pengaruh ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera Lam.*) terhadap kadar interleukin-1 beta (Il-1 $\beta$ ) dan gambaran histopatologi Pulau Langerhans pankreas pada *Rattus norvegicus* strain Wistar dengan perlakuan diet aterogenik”**. Dengan penuh rasa hormat dan ketulusan hati penulis mengucapkan terimakasih kepada segenap pihak yang secara langsung maupun tidak langsung telah membantu dalam penyelesaian penyusunan skripsi ini. Ucapan terimakasih penulis kepada :

1. Dr. Sri Murwani, drh., MP dan Prof. Dr. Pratiwi Trisunuwati, drh., MS selaku dosen pembimbing atas segala bimbingan, motivasi dan kesabaran yang luar biasa selama penulisan Tugas Akhir ini sehingga Tugas Akhir ini dapat terselesaikan dengan baik.
2. drh. Rositawati Indrati, MP dan drh. Dahliatul Qosimah, M. Kes selaku dosen penguji atas segala ilmu, masukan dan dukungan dalam penyempurnaan penulisan tugas akhir ini.
3. Dr. dr. I Ketut Gede Muliarta, Sp.PA atas segala kesabarannya memberikan bantuan, dan bimbingannya selama pembacaan gambaran histopatologi.
4. Ayahanda Khomarudin dan Ibunda Ribut Fatoyah, Kakak tersayang Krisna Vindya Hajar al Kahfi dan Dhafi el Harsya atas setiap pengorbanan, dan kasih sayang. Semoga Allah membalas dengan surgaNya.



5. Seluruh staf laboratorium ilmu Faal dan laboratorium Histologi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah banyak membantu dalam pelaksanaan pengujian ELISA, dan pembuatan preparat histologi.
6. Partner seperjuangan sekaligus saudaraku di *Atherogenic Project* Ari Purnamasari, Ayu Romadhoni, Galuh Candra, Widha Cipta, Falla Zuhdi, dan Yazid Busthomi atas semua kerjasama, bantuan dan semangatnya.
7. Sahabatku terkasih Sonya Loresta, Ari P, Candra Luqmana, serta seluruh teman-teman PKH angkatan 2009 atas mimpi, kenangan dan imajinasinya.
8. Mas Didin, dan mas-mas yang membantu dan memfasilitasi penyediaan kandang perlakuan di Klinik Hewan Pendidikan Program Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya.
9. Teman-Teman kost Kertorahayu 08 (Mba chin, Mba Rinda, Phipi, Galuh, Desta, Indah, dan Hesti) atas tawa dan kehangatannya.
10. Semua pihak dan orang-orang yang penulis sayangi yang telah banyak membantu semoga Allah SWT selalu memberikan kebaikan serta selalu melimpahkan rahmatNya

Akhirnya penulis berharap semoga karya penelitian ini dapat memberikan manfaat dan kebaikan bagi ilmu pengetahuan dan sesama.Aamiin.

Malang, September 2013

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iii
<b>ABSTRAK</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	vi
<b>DAFTAR ISI</b> .....	viii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	x
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xi
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xii
<b>DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG</b> .....	xiii
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Batasan Masalah .....	3
1.4 Tujuan Penelitian .....	4
1.5 Manfaat Penelitian .....	5
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	6
2.1 Definisi Aterosklerosis .....	6
2.2 Faktor-Faktor yang mempengaruhi Aterosklerosis .....	7
2.2.1 Lipoprotein dan obesitas .....	7
2.2.2 Hipertensi .....	8
2.2.3 Polusi udara .....	8
2.2.4 Aktivitas estrogen .....	9
2.2.4 Aktivitas fisik .....	9
2.3 Komposisi diet aterogenik .....	9
2.3.1 Kolesterol .....	9
2.3.2 Asam Kolat .....	10
2.3.3 Minyak Babi .....	10
2.4 Interleukin 1 .....	11
2.5 Peran sitokin IL-1 $\beta$ pada proses inflamasi dan resistensi insulin .....	12
2.6 IL-1 $\beta$ dan resistensi insulin .....	14
2.6.1 Insulin .....	14
2.6.2 Sintesis dan regulasi pelepasan insulin .....	15
2.7 Peran IL-1 $\beta$ dalam resistensi insulin dan kerusakan pulau Langerhans pankreas .....	15
2.8 Daun kelor ( <i>Moringa oleifera Lam.</i> ) .....	19
2.7.1 Senyawa Fitokimia <i>Moringa oleifera Lam.</i> .....	21
2.8 Mekanisme inhibisi dan proteksi flavonoid .....	21
<b>BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS</b> .....	23
4.1 Kerangka konseptual .....	23
4.1 Hipotesis penelitian .....	26

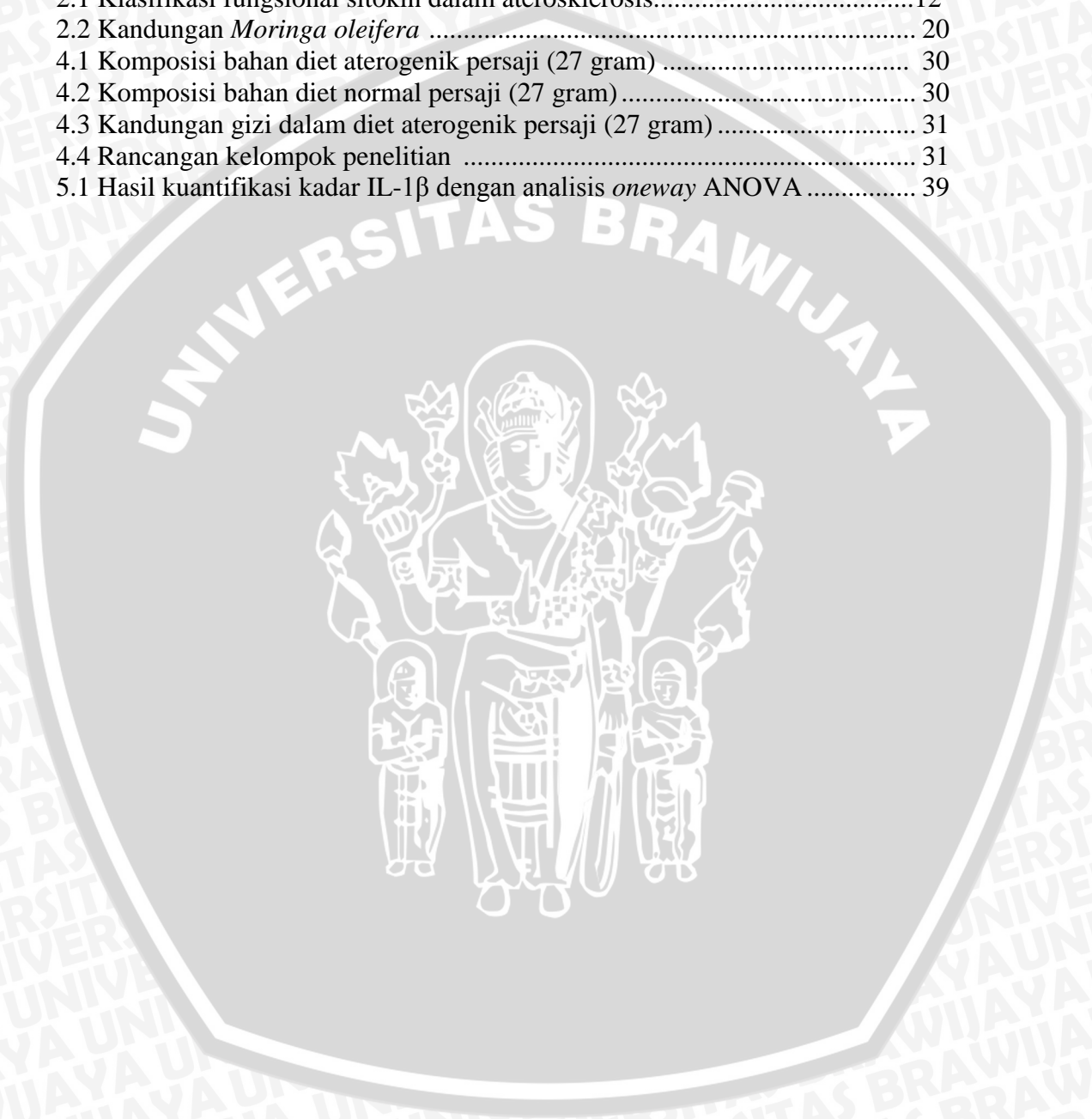


<b>BAB 4. METODOLOGI PENELITIAN</b> .....	27
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	27
4.2 Alat dan bahan penelitian .....	27
4.3 Tahapan penelitian .....	28
4.4 Prosedur kerja .....	33
<b>BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	38
5.1 Pengaruh <i>Moringa oleifera Lam.</i> terhadap produksi IL-1 $\beta$ pada <i>R. norvegicus</i> stadium awal aterosklerosis .....	38
5.2 Pengaruh <i>Moringa oleifera Lam.</i> terhadap gambaran histopatologi pulau Langerhans <i>R. norvegicus</i> stadium awal aterosklerosis .....	43
<b>BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	51
6.1 Kesimpulan .....	51
6.2 Saran .....	51
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	52
<b>LAMPIRAN</b> .....	61
<b>Surat Pernyataan</b> .....	81



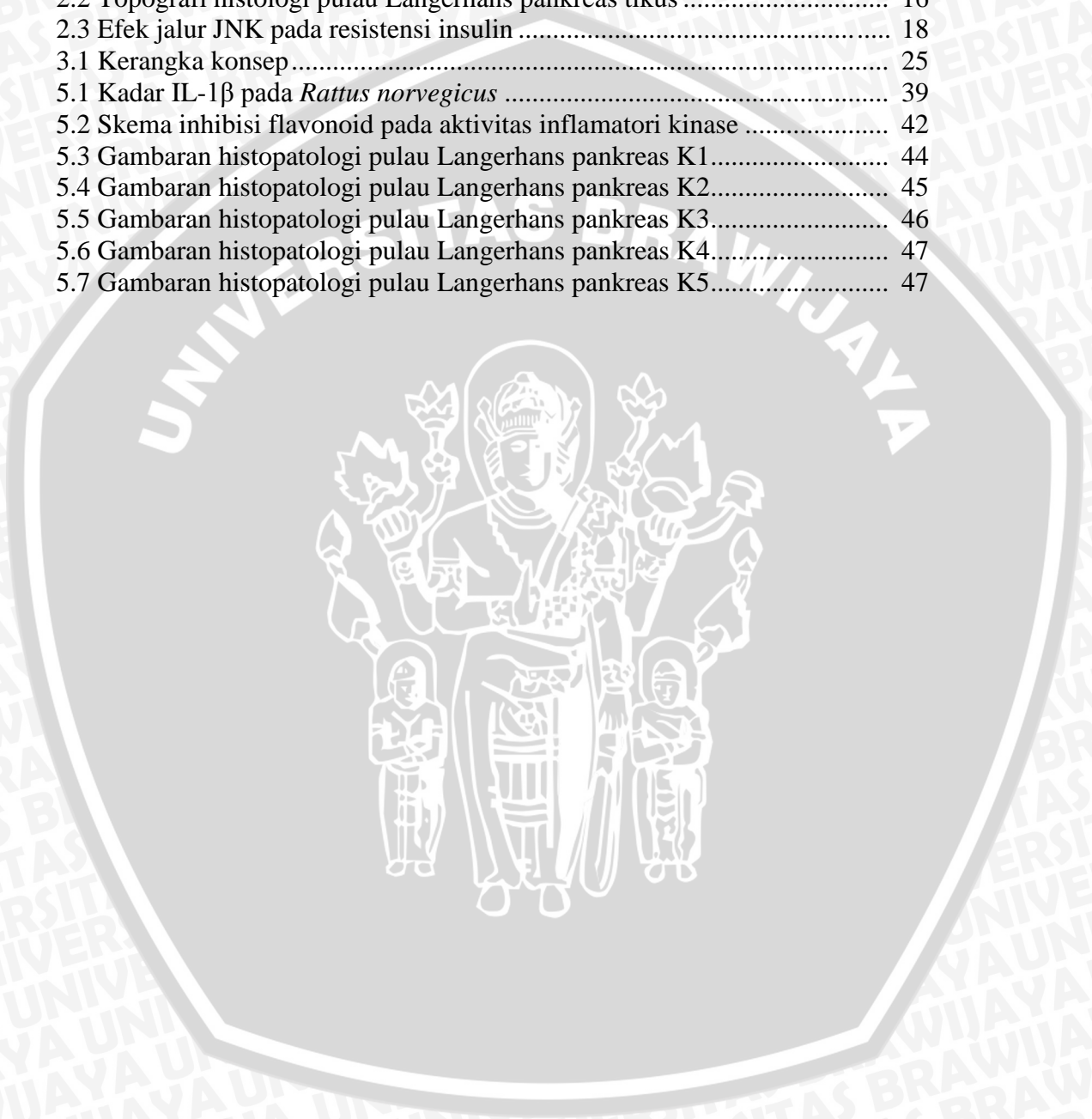
**DAFTAR TABEL**

Tabel	Halaman
2.1 Klasifikasi fungsional sitokin dalam aterosklerosis.....	12
2.2 Kandungan <i>Moringa oleifera</i> .....	20
4.1 Komposisi bahan diet aterogenik persaji (27 gram) .....	30
4.2 Komposisi bahan diet normal persaji (27 gram).....	30
4.3 Kandungan gizi dalam diet aterogenik persaji (27 gram).....	31
4.4 Rancangan kelompok penelitian .....	31
5.1 Hasil kuantifikasi kadar IL-1 $\beta$ dengan analisis <i>oneway</i> ANOVA.....	39



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Gambaran histologi normal pulau Langerhans pankreas ruminansia .....	16
2.2 Topografi histologi pulau Langerhans pankreas tikus .....	16
2.3 Efek jalur JNK pada resistensi insulin .....	18
3.1 Kerangka konsep .....	25
5.1 Kadar IL-1 $\beta$ pada <i>Rattus norvegicus</i> .....	39
5.2 Skema inhibisi flavonoid pada aktivitas inflamatori kinase .....	42
5.3 Gambaran histopatologi pulau Langerhans pankreas K1 .....	44
5.4 Gambaran histopatologi pulau Langerhans pankreas K2 .....	45
5.5 Gambaran histopatologi pulau Langerhans pankreas K3 .....	46
5.6 Gambaran histopatologi pulau Langerhans pankreas K4 .....	47
5.7 Gambaran histopatologi pulau Langerhans pankreas K5 .....	47



## DAFTAR LAMPIRAN

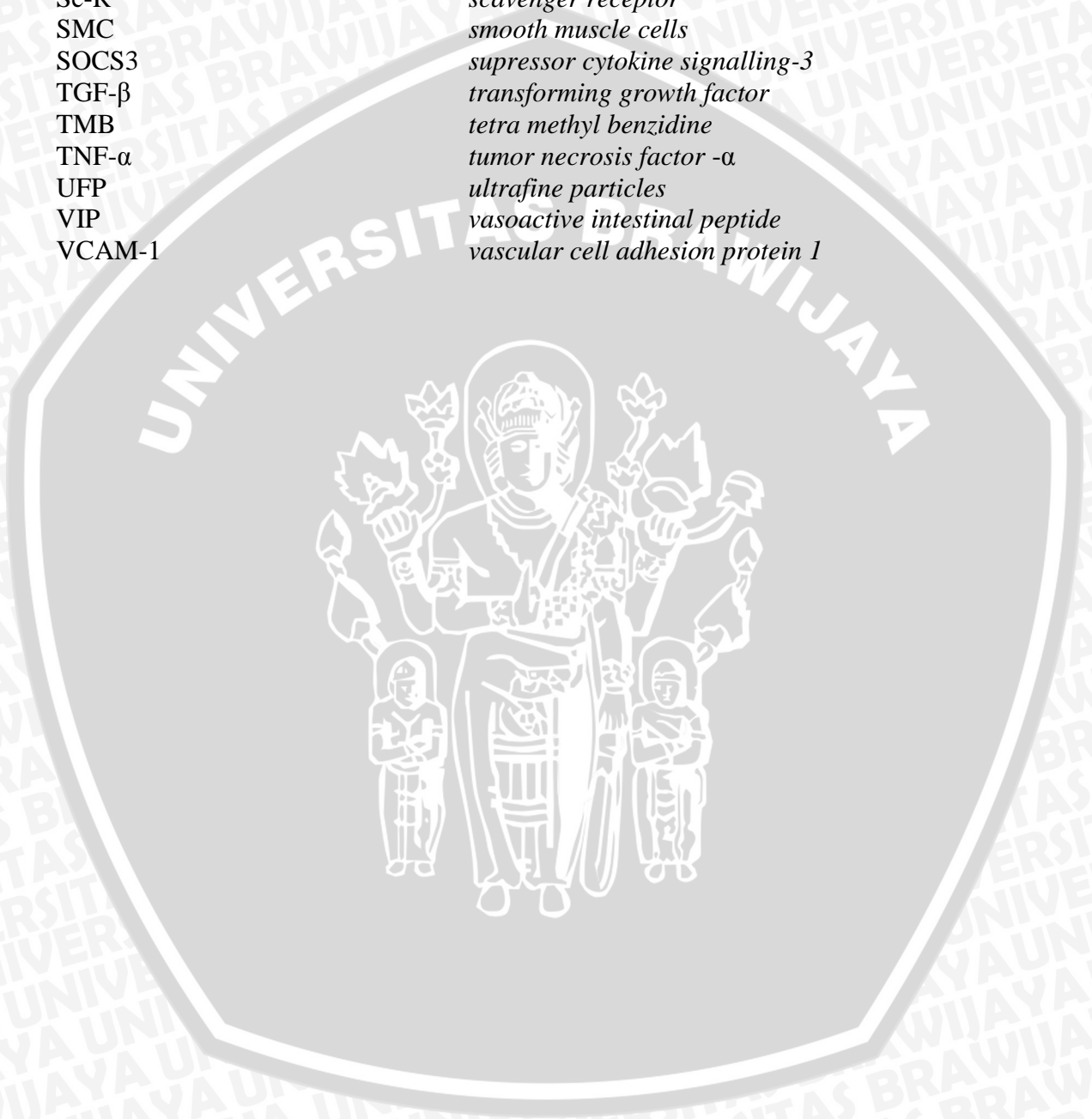
Lampiran	Halaman
1. Skema tahapan penelitian .....	61
2. Hasil pemeriksaan kadar IL-1 $\beta$ .....	63
3. Analisis statistika; pengujian hasil kadar IL-1 $\beta$ .....	64
3.1 Uji homogenitas .....	64
3.2 Uji normalitas .....	64
3.3 oneway ANOVA .....	65
3.4 Post hoc test .....	66
3.5 Homogenous subsets .....	66
4. Analisa statistika; Berat badan hewan coba .....	67
4.1 Uji homogenitas .....	67
4.2 Uji normalitas .....	67
4.3 oneway ANOVA .....	68
5. Perhitungan dosis ekstrak <i>Moringa oleifera Lam</i> .....	69
6. Tabel Berat badan hewan coba selama pemeliharaan .....	71
7. Tabel perhitungan <i>body mass index</i> (BMI) .....	72
8. Tabel konsumsi diet atherogenik hewan coba selama pemeliharaan .....	73
9. Dokumentasi penelitian .....	78
10. Surat keterangan laik etik .....	80

## DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

Simbol/Singkatan	Keterangan
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CoA	<i>coenzim-A</i>
COX	<i>cyclooxygenase</i>
ECM	<i>extracellular membrane</i>
EDCF	<i>endothelium-derived contracting factor</i>
eIf2 $\alpha$	<i>eukaryotic initiation factor-2 alpha</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
FFA	<i>free fatty acid</i>
FoxO1	<i>forkhead box protein</i>
GLUT-4	<i>glucose transporter-4</i>
GIP	<i>gastric inhibitory polypeptide</i>
GLP-1	<i>glucagon like peptide-1</i>
HE	<i>hematoxylin-eosin</i>
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IFN- $\gamma$	<i>interferon gamma</i>
IKK- $\kappa$	<i>inhibitory subunit 1-kb kinase</i>
IL-1	<i>interleukin 1</i>
IL-4	<i>interleukin 4</i>
IL-5	<i>interleukin 5</i>
IL-6	<i>interleukin 6</i>
IL-8	<i>interleukin 8</i>
IL-9	<i>interleukin 9</i>
IL-12	<i>interleukin 12</i>
IL-13	<i>interleukin 13</i>
IL-17	<i>interleukin 17</i>
IRS-1	<i>insulin receptor substrate 1</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
MAPKs	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MCP-1	<i>monocyte chemotactic factor</i>
MMP-2	<i>matrix metalloproteinase-2</i>
m-RNA	<i>messenger- ribonucleic acid</i>
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor kappa-B</i>
NK	<i>natural killer</i>
NO	<i>nitric oxide</i>
OD	<i>optical density</i>
PAI-1	<i>plasminogen activator inhibitor type 1</i>
PACAP	<i>pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide</i>
PBS	<i>phospat buffer saline</i>
PIP-3	<i>phosphatidylinositol phosphate</i>
PM	<i>particulate matter</i>

RER  
PERK  
ROS  
Sahrp  
Sc-R  
SMC  
SOCS3  
TGF- $\beta$   
TMB  
TNF- $\alpha$   
UFP  
VIP  
VCAM-1

*rough endoplasmic reticulum*  
*pancreatic ER kinase*  
*reactive oxygen species*  
*streptavidin horseradish peroxidase*  
*scavenger receptor*  
*smooth muscle cells*  
*supressor cytokine signalling-3*  
*transforming growth factor*  
*tetra methyl benzidine*  
*tumor necrosis factor - $\alpha$*   
*ultrafine particles*  
*vasoactive intestinal peptide*  
*vascular cell adhesion protein 1*





## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Aterosklerosis dengan manifestasi klinik penyakit jantung koroner (PJK) dan stroke merupakan salah satu penyakit yang menjadi masalah kesehatan terbesar di dunia kesehatan, baik pada manusia dan hewan. Angka prevalensi tingkat kelebihan berat badan dan angka obesitas pada anjing tua di United States mencapai 34,1%, dengan angka prevalensi penyakit jantung mencapai 3,8% pada anjing yang mengalami obesitas dan 3,4% pada anjing yang memiliki berat badan berlebih (Lund *et al.*, 2006). Peningkatan angka obesitas berkorelasi terhadap peningkatan angka predisposisi penyakit kardiovaskuler, salah satunya disfungsi endotel hingga berakibat pada aterosklerosis (Vilahur *et al.*, 2011).

Sejumlah 8.159 data *Veterinary clinical science department college of veterinary medicine University of Minnessota* dan hasil data *Analysis National Companion Animal Study Population* sejumlah 11.102 kucing dewasa, dilaporkan 35,1 % kucing yang berumur lebih dari 1 tahun mengalami kondisi obesitas dan memiliki kelebihan berat badan, dengan angka kejadian penyakit jantung 1,7 % pada kucing obesitas dan 2,1 % pada kucing yang memiliki kelebihan berat badan (Lund *et al.*, 2005). Berdasarkan data *World Health Organization* (WHO) tahun 2003 sebanyak 30 persen kematian di dunia dan 45 persen kematian di negara berkembang disebabkan oleh penyakit kardiovaskuler dan diperkirakan akan mengalami peningkatan hingga 11 juta orang. Di Indonesia angka penderita diperkirakan akan mengalami peningkatan setiap tahunnya karena pesatnya perubahan gaya hidup. Pertumbuhan angka obesitas akan dipicu oleh

meningkatnya aktivitas fisik yang kurang serta konsumsi kalori yang berlebih (Anonim, 2003).

Beberapa hewan telah digunakan untuk mengetahui mekanisme aterosklerosis diantaranya tikus, anjing, primata, babi, kelinci (Bodary *et al.*, 2009). Tikus merupakan hewan yang sering digunakan karena tikus memiliki informasi genetik yang mudah untuk diidentifikasi, memiliki ukuran tubuh yang kecil sehingga efisien untuk digunakan dalam jumlah besar dan mempermudah konversi dalam data statistik, tikus memiliki durasi gestasi yang pendek sehingga dapat meminimalisir penggunaan biaya farmakologi saat digunakan sebagai hewan coba aterosklerosis (Whitman, 2004).

Aterosklerosis merupakan pengerasan dan penebalan arteri oleh akumulasi kolesterol dan fibrosis pada endotel akibat ketidakseimbangan influks maupun efluks kolesterol dalam darah (Jager *et al.*, 2007). Diet aterogenik memicu kondisi obesitas, memegang peranan penting untuk terjadinya inflamasi sistemik kronik, dan berhubungan dengan metabolik sindrom. Metabolik sindrom merupakan kondisi peningkatan resiko dari penyakit kardiovaskuler dan resistensi insulin (diabetes tipe 2) yang dipicu oleh kondisi kolesterol berlebih dalam tubuh. Sitokin proinflamasi ditemukan diekspresikan berlebih pada saat kondisi peningkatan kolesterol dalam tubuh. Kondisi ini dapat menyebabkan predisposisi seperti hipertensi, aterosklerosis, dislipidemia, dan resistensi insulin (Emanuela *et al.*, 2011). Peningkatan sitokin inflamasi seperti IL-1 $\beta$  pada saat inflamasi akan menyebabkan intoleransi glukosa dan resistensi insulin. IL-1 $\beta$  menghambat

terjadinya *signaling receptor insulin* GLUT-4 melalui reseptor IRS-1. Keadaan resistensi insulin akan menyebabkan perubahan gambaran histopatologi *Islet Langerhans* pankreas (Jager *et al.*, 2007).

Daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) famili dari *moringaceae* atau dikenal dengan nama *drum stick* merupakan tanaman yang bermanfaat bagi kesehatan di daerah tropis. *Moringa oleifera* memiliki kandungan antioksidan flavonoid. (Rajanandh *et al.*, 2012). Antioksidan flavonoid memiliki efek anti aterosklerotik, dan anti inflamasi (Havsteen, 2002) Maka perlu dilakukan penelitian mengenai kadar dari IL-1 $\beta$  dan gambaran histopatologi pulau Langerhans pankreas pada hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar yang diberi diet aterogenik untuk mengetahui efek anti aterosklerosis menggunakan ekstrak air daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.).

## 1.2 Rumusan Masalah

- 1.2.1 Apakah ekstrak daun kelor *Moringa oleifera* Lam. memiliki efek anti aterosklerosis dengan menurunkan kadar IL-1 $\beta$  dari *Rattus norvegicus* yang mengalami aterosklerosis dengan pemberian diet aterogenik?
- 1.2.2 Apakah ekstrak daun kelor *Moringa oleifera* Lam. memiliki efek anti aterosklerosis dengan menurunkan gambaran kerusakan histologi pulau Langerhans pankreas dari *Rattus norvegicus* yang mengalami aterosklerosis dengan pemberian diet aterogenik?

### 1.3 Batasan Masalah

1.3.1 Hewan coba yang digunakan yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) sejumlah 30 ekor, jantan, dengan usia 8 minggu, berat 120-172 gram, diperoleh dari Laboratorium ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Penggunaan hewan coba dalam penelitian ini telah mendapat sertifikasi laik etik oleh Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya.

1.3.2 Pemberian diet aterogenik sebesar 27 gram/hari/tikus (Lampiran 8).

1.3.3 Dosis ekstrak *Moringa oelifera Lam.* yang diberikan kepada hewan coba sebesar 0,034 ml (K1), 0,06 ml (K2), dan 0,115 ml (K3) diberikan secara oral (PO) (Lampiran 5).

1.3.4 Variabel tergantung yang diamati yaitu kadar IL-1 $\beta$  dan gambaran histopatologi pulau Langerhans pankreas.

### 1.4 Tujuan Penelitian

1.4.1 Tujuan umum dari penelitian ini yaitu:

Mengetahui efek anti aterosklerosis pada *Moringa oleifera Lam.*

1.4.2 Tujuan khusus dari penelitian ini yaitu:

1.4.2.1 Mengetahui kadar IL-1 $\beta$  paska perlakuan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera Lam.*) pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang mengalami aterosklerosis stadium awal.

1.4.1.2 Mengetahui gambaran histologi pulau Langerhans pankreas tikus (*Rattus norvegicus*) yang mengalami aterosklerosis stadium awal setelah mendapat ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera Lam.*).

## 1.5 Manfaat Penelitian

### 1.5.1 Manfaat teoritis

Melalui penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan mengenai kemampuan ekstrak *Moringa oleifera Lam.* dalam menurunkan kadar IL-1 $\beta$  dan menurunkan kerusakan gambaran histopatologi pulau Langerhans pankreas tikus yang diberi diet aterogenik.

### 1.5.2 Manfaat praktis

Ekstrak air *Moringa oleifera Lam.* dapat diaplikasikan sebagai anti aterosklerosis pada manusia dan juga pada hewan.

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Definisi aterosklerosis

Aterosklerosis merupakan penyakit dengan karakteristik disfungsi endotel, inflamasi pada vaskuler, akumulasi dari lipid, kolesterol, kalsium, seluler debris pada intima vaskuler, berbagai akumulasi tersebut akan terbentuk plak, vaskuler *remodelling*, obstruksi pada luminal baik akut maupun kronik, abnormalitas pada aliran darah, hingga menurunnya suplai oksigen dari organ (Orford *and* Selwyn, 2005).

Lesi aterosklerosis menurut *American Heart Association classification* yang dimodifikasi oleh Virmani *et al.* (2000) dan Naghavi *et al.* (2003) dibedakan menjadi dua macam yaitu lesi intima nonaterosklerotik dan lesi aterosklerotik *progressive*. Penebalan dan pembentukan lesi intima pada plak nonaterosklerotik terjadi oleh akumulasi dari matriks kaya akan proteoglikan pada otot polos dan berkorelasi dengan akumulasi matriks yang terjadi akibat faktor aktivitas fibroblastik hingga menyebabkan stenosis pada arteri kecil (Dermengiu *et al.*, 2010). Sedangkan lesi aterosklerotik *progressive* terjadi akibat deposit lipid dan berkumpulnya makrofag dan limfosit T pada bagian intima hingga menyebabkan terbentuk *fibrous cap* dan terjadi reaksi inflamatori (Libby *et al.*, 2011). Tingkat keparahan lesi aterosklerosis didasarkan pada ketebalan lapisan jaringan fibrosa dan tingkat infiltrasi dari inflamasi. Lesi akan berkembang dari *fatty streak* menjadi atheroma. *Fatty streak* merupakan guratan lemak pada dinding endotel sebagai manifestasi awal terbentuknya aterosklerosis, selanjutnya lamina elastis

eksternal dari pembuluh darah akan mengalami perluasan untuk mengakomodasi manifestasi lesi dan mempertahankan bentuk lumen (Schwartz *et al.*, 1998). Perluasan akibat lesi yang mengandung makrofag maupun sel limposit T akan berlangsung sampai 180 persen dari luas asalnya.

## 2.2. Faktor-faktor yang mempengaruhi aterosklerosis

### 2.2.1. Lipoprotein dan obesitas

Lipoprotein plasma mempunyai perbedaan karakteristik fisik dan kimia seperti ukuran, kepadatan, dan komposisi. Lipoprotein pada mamalia dapat dibagi berdasarkan kepadatan terhidrasi mereka menjadi empat kelas utama yaitu (1) *chylomicrons*, (2) *very low-density lipoproteins* (VLDL), (3) *low-density lipoproteins* (LDL), dan (4) *high-density lipoproteins* (HDL) (Maldonado *et al.*, 2001). Peningkatan kadar lipoprotein pada mamalia seiring dengan peningkatan BMI (*body mass index*) yang berkaitan dengan obesitas yang memiliki resiko terhadap aterosklerosis. Lipoprotein merupakan LDL-like moiety yang ditemukan dalam sirkulasi darah dan berikatan dengan apolipoprotein. Kompleks ikatan LDL dengan apolipoprotein akan membentuk struktur domain dengan enzim fibrinolitik plasminogen sehingga bersifat protrombotik, ikatan ini sensitif terhadap proses oksidasi dan bersifat aterogenik (Panagiotis *et al.*, 2008). Telah diketahui peningkatan kadar *low density lipoprotein* dalam darah juga menginduksi aktivasi platelet sebagai respon akibat cedera vaskular melalui fosforilasi dari P38 MAPK platelet (Calzada *et al.*, 2007).

Aktivasi dari platelet telah diketahui berperan dalam proses pembentukan aterosklerosis pada studi hewan model tikus, dengan memodulasi aktivasi dari matriks ekstraseluler bekerja pada daerah yang mengalami cedera pembuluh darah dan melakukan rekrutmen terhadap aktivitas koagulan dan pembentukan fibrin hingga menimbulkan semakin besarnya sumbatan dalam pembuluh darah (Nieswandt *et al.*, 2005).

### 2.2.2. Hipertensi

Hipertensi berkaitan dengan perubahan morfologi dari intima pada vaskuler dan perubahan fungsional dari endotelium yang memiliki perubahan hampir sama pada hiperkolesterolemia dan aterosklerosis (Orford *and* Selwyn, 2005). Keadaan hipertensi akan menurunkan dan mengganggu respon dinding vaskuler terhadap *endothelium dependent vasodilatation* hingga menurunkan aktivitas NO (*Nitric oxide*) dan *endothelium-derived contracting factors* (EDCF) dan memicu penurunan elastisitas endotel keadaan ini dinamakan disfungsi endotel (Versari *et al.*, 2009).

### 2.2.3. Polusi udara

Mutlu, Green, Bellmeyer (2007) induksi tikus dengan ambien PM (*particulate matter*) sejumlah (1,3-6) menimbulkan kecenderungan peningkatan trombosis, menyebabkan peningkatan kemampuan trombosis pada arteri yang mengalami *injury*, penurunan *bleeding time*, peningkatan angka platelet dan juga peningkatan jumlah sel inflamatori maupun sitokin. Studi pada tikus dan watanabe menunjukkan peningkatan keparahan aterosklerosis pada lesi aorta dan



peningkatan apolipoprotein E dengan induksi udara terkonsentrasi UFPs (*Ultrafine particles*) dan PM 2.5 intrafaringeal secara kronis (Sun *et al.*, 2005 ; Suwa *et al.*, 2002). Polusi udara yang mempunyai dampak meningkatkan ROS dan berkaitan dengan nekrosis miokard, disfungsi vaskular, dan apoptosis, dan beberapa efek lain yang secara efektif diblokir oleh *scavenger* radikal bebas (Steinberg, 2002).

#### **2.2.4. Aktivitas estrogen**

Derajat kerentanan aterosklerosis dapat dipengaruhi oleh hormon estrogen yang dihasilkan oleh hewan betina maupun wanita dan dipengaruhi oleh latar belakang genetik, dimana estrogen bersifat proteksi terhadap manifestasi dari aterosklerosis dengan meningkatkan produksi MMP-2 yang mencegah akumulasi kolagen pada intima (Potier *et al.*, 2003).

#### **2.2.5. Aktivitas fisik**

Aktivitas fisik mempengaruhi sepertiga dari pengeluaran energi dengan berat normal. Saat berolahraga kalori terbakar makin sering berolahraga maka semakin banyak kalori yang hilang. Kalori secara langsung mempengaruhi sistem energi basal dan menurunkan akumulasi kolesterol dalam darah (Pian, 2006). Aktivitas fisik yang dapat disarankan sebagai usaha pencegahan akumulasi kolesterol pada anjing maupun kucing diantaranya latihan dengan *treadmill*, berjalan, berenang, hidroterapi, dan menambah aktivitas bermain (German, 2005).

### **2.3 Komposisi diet aterogenik**

#### **2.3.1 Kolesterol**

Bahan yang digunakan untuk menginduksi peningkatan kolesterol diantaranya lemak kambing 10%, kuning telur bebek 5%, minyak kelapa 1% dari komposisi total diet aterogenik dapat dilihat pada tabel 4.2 (Rahmah, 2010). Kolesterol digunakan untuk memediasi peningkatan sitokin serta menginduksi respon inflamasi akut (Vergnes *et al.*, 2003).

### 2.3.2 Asam kolat

Asam kolat merupakan asam empedu, substansi kristal putih yang tidak terlarut dalam air dan terlarut dalam alkohol dan asam asetat dengan titik didih 200 sampai 201° C. Asam kolat, bersama dengan asam chenodeoxycholic, merupakan salah satu dari dua asam empedu utama yang dihasilkan oleh hati dimana akan disintesis dari kolesterol, salah satu dari dua asam empedu utama, turunan kolat mewakili sekitar delapan puluh persen dari semua asam empedu. Derivatif ini terbuat dari choyl-CoA, yang pertukaran yang CoA dengan baik glisin, atau taurin, menghasilkan asam glycocholic dan taurocholic (Chiang, 2009).

Vergnes *et al.* (2003) pemberian asam kolat pada diet aterogenik bertujuan mencegah konversi kolesterol menjadi asam empedu. Efek sinergis dapat ditimbulkan pada pemberian kolesterol bersamaan dengan pemberian asam kolat terhadap kadar lemak dalam hepar dan juga plasma.

### 2.3.3 Minyak babi

Berdasarkan USDA *nutrient database* kandungan minyak babi per 100 mg adalah Energi sejumlah 900 kkal, lemak sejumlah 100 gr; *saturated* 39 gram;

*monosaturated* sejumlah 45 gram; *polysaturated* sejumlah 11 gram, kolesterol sejumlah 96 mg, *zinc* sejumlah 0,1 mg, selenium 0,2 mg. Minyak babi memiliki 25% *saturated fat* dari pada setiap sendok makan (15 ml). Konsumsi *saturated fat* dapat menginduksi produksi dari inflammasi mediator, prostaglandin (PG)E(2), interleukin 1 beta (IL)-1 $\beta$ , IL-6, dan *tumor necrosis factor alpha* (TNF-alpha) (Han *et al.*, 2002). Pemberian minyak babi selama 8 minggu atau 60 hari dapat menginduksi terbentuknya *foam cell* atau sel busa (Rahmah, 2010).

#### 2.4 Interleukin 1

Interleukin 1 merupakan sitokin yang diproduksi saat dipicu oleh beberapa faktor diantaranya stres, infeksi mikrobial, reaksi toksik, *Immune Complexes* dan *cell injury* (Vicenova *et al.*, 2008 ; Nathan, 2002). Interleukin 1 merupakan prekursor dengan berat 31 kDa yang telah mengalami pembelahan proteolitik oleh protease spesifik selama maturasi. Interleukin 1 mayor diproduksi oleh makrofag tetapi beberapa studi juga menyatakan sel neutrofil, limfosit, sel dendritik, keratinosit, sel-sel endotel, hepatosit, fibroblas atau sel otot telah terbukti juga mensintesis IL-1. Target sel dari interleukin 1 adalah sel-sel imun seperti limfosit, monosit, granulosit, sel dendritik dan juga sel-sel epitel, fibroblast, sel endotel atau sel otot polos (Vicenova *et al.*, 2008). Interleukin 1 diduga memicu perkembangan lesi dini dengan cara meningkatkan aktivitas adhesi leukosit pada sel endothel dan meningkatkan migrasi leukosit. Kemudian pada plak yang sudah lanjut induksi IL-1 pada MMP dapat menyebabkan ruptur plak karena destabilisasi protein cap (Von *et al.*, 2003).

## 2.5 Peran sitokin IL-1 $\beta$ dalam proses inflamasi dan resistensi insulin

**Tabel 2.1.** Klasifikasi fungsional sitokin dalam aterosklerosis

sitokin	cell source	famili sitokin	deteksi dalam plak	signal primer
<b><i>Pro-atherogenic</i></b>				
IL-1 $\beta$	M, L, EC, dan SMC	IL-1	+	p38/NF- $\kappa$ B
IL-6	M,L,EC, dan SMC	IL-6	+	JAK1/STAT3
IL-8	M, L, EC, dan SMC	IL-8	+	GPCR/NF- $\kappa$ B
IL-12	M, L	IL-6	+	JAK2/STAT3
IL-18	M	IL-1	+	p38/NF- $\kappa$ B
IFN- <i>gamma</i>	M, L, EC, dan SMC	IFN	+	JAK1/STAT1,2
TNF $\alpha$	M, L, dan SMC	TNF	+	p38/NF- $\kappa$ B
<b><i>Anti-atherogenic</i></b>				
IL-10	M, L	IL-10	+	JAK1/STAT1,3,5
IL-33	M, L	IL-1	+	p38/NF- $\kappa$ B
TGF $\beta$	M, L, SMC, dan P	TGF	+	SMAD2,3
<b><i>Likely atherogenic</i></b>				
IL-4	L	IL-4	+	JAK1/STAT5

Keterangan : EC: *endothelial cell*, L: *lymphocyte*, M: *monocyte/macrophage*, P: *platelet*, dan SMC: *smooth muscle cell*

Sumber : Modifikasi (Autieri, 2012).

Sitokin bekerja dengan mengikat reseptor sel membran, kemudian membawa *second messenger* menghasilkan sinyal ke sel untuk meregulasi ekspresi dari suatu gen. Beberapa sitokin yang meregulasi mekanisme inflamasi dari abnormalitas aterosklerosis dibagi menjadi 9 famili yaitu interleukin (IL)-1, IL-2/IL-4, IL-6/IL-12, interferon (IFN), *tumour necrosis factor* (TNF), *chemokines*, IL-10, *transforming growth factor*  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) dan IL-17 ,beberapa

sitokin yang berperan dalam pembentukan aterosklerosis dan juga sitokin yang berperan sebagai anti aterosklerosis juga diklasifikasikan untuk mengkategorikan sitokin secara fungsional Tabel 2.1 (Girn *et al.*, 2007 ; Autieri, 2012).

Interleukin 1 atau IL-1 adalah salah satu sitokin proinflamatori yang merupakan mediator penting dari reaksi inflamasi dan dihubungkan dengan pembentukan atau formasi awal dari plak (Libby, 2002). IL-1 $\beta$  terlibat dalam meningkatkan ekspresi molekul adhesi sel pada permukaan endotel oleh karena itu telah dianggap sebagai sitokin pro atherogenik (Libby, 2002).

Pe'russe *et al.* (2001) beberapa hormon dan sitokin yang terkait dalam regulasi energi yang diproduksi oleh sel adiposit ketika kadar lipid dalam darah mengalami peningkatan, antara lain leptin, resistin, adiponektin, TNF- $\alpha$ , PAI-1, IL-1, IL-6 dan hormon estrogen serta testosteron. Dimana marker perkembangan lesi aterosklerotik yaitu beberapa sel inflamasi diantaranya makrofag, limfosit T. Inisiasi dari apoptosis diinduksi dari beberapa sitokin proapoptosis yaitu TNF- $\alpha$  dan produksi dari ROS (*reactive oxygen species*) oleh makrofag (Tabas, 2005).

Menurut Spagnoli *et al.* (2007) IL-1 $\beta$  merupakan sitokin proinflamatori yang dihasilkan oleh aktivitas makrofag di endotel. Hubungan antara IL-1 $\beta$  dan proses perkembangan lesi aterosklerosis dimulai ketika kadar LDL dalam darah mengalami peningkatan. Dimana peningkatan konsentrasi dari oxLDL akan memicu makrofag melakukan proses fagositosis LDL teroksidasi. Peningkatan makrofag menginduksi produksi dari sitokin proinflamatori IL-1 $\beta$  dan memicu respon inflamasi pada dinding pembuluh darah dengan pelepasan sitokin inflamasi

IL-1 $\beta$  dan aktivasi dari NF-K $\beta$  melalui fosforilase subunit  $\beta$  dari *inhibitory subunit I- $\kappa$ B kinase* (IKK- $\kappa$ ). Aktivasi dari NF- $\kappa$ B akan menginduksi sel-sel inflamasi mengalami perlekatan ke dinding pembuluh darah. Aktivitas sitokin proinflamatori, dan sel-sel inflamasi akan berkembang menjadi lesi aterosklerotik yang selanjutnya akan mengalami predisposisi memicu abnormalitas fungsi dari organ lain seperti gagal ginjal, atau gagal jantung akibat infark myokardial. (Sonnenberg *et al.*, 2004 ; Vicenova *et al.*, 2008).

## 2.6 IL-1 $\beta$ dan Resistensi insulin

### 2.6.1 Insulin

Deskripsi insulin Wilcox (2005) merupakan hormon peptida yang disekresikan oleh sel  $\beta$  dari islet langerhans dan mempunyai peran untuk menjaga kadar normal glukosa darah. Hormon peptida merupakan hormon yang berperan dalam aktivitas endokrin, beberapa peptida dapat berperan sebagai neurotransmitter yang memberikan *signalling* terhadap beberapa hormon saat melakukan kerjanya di sel, ketika hormon peptida dilepaskan dalam darah dan melakukan ikatan dengan reseptor pada *cell surface*, maka timbul *second messenger* pada sitoplasma pada sel akan terpicu untuk melakukan kerjanya dalam sel (Wermuth, 2003).

Insulin bekerja melalui absorpsi glukosa seluler, regulasi metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein, serta mendorong pemisahan dan pertumbuhan sel melalui efek motigenik pada insulin (Wilcox, 2005). Efek motigenik merupakan efek yang memicu terjadinya mitosis pada sel (Urs *et al.*, 2003).

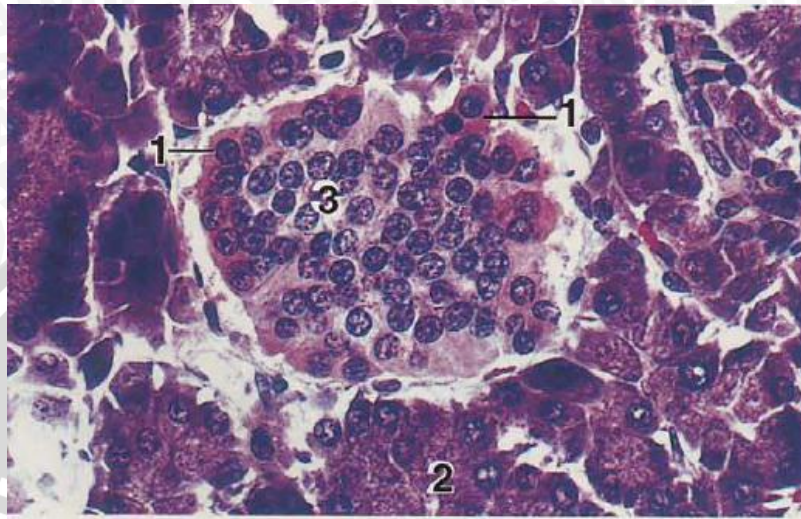
### 2.6.2 Sintesis dan regulasi pelepasan insulin

Insulin dikode oleh kromosom lengan pendek 117 dan disintesis oleh sel  $\beta$  dari islet langerhans dan proinsulin sebagai prekursornya. Proinsulin disintesis di ribosom pada retikulum endoplasma kasar (RER) dari mRNA sebagai pre-proinsulin ketika kondisi kadar gula yang tinggi di dalam tubuh akan memicu pelepasan insulin yang disekresikan oleh sel  $\beta$  kondisi ini disebut sebagai *glucose-mediated insulin secretion*. Vesikel sekretori dari sel  $\beta$  akan mengirim proinsulin dari retikulum endoplasma ke badan golgi sel  $\beta$ . Enzim di luar badan golgi akan mengubah proinsulin menjadi insulin, insulin akan di simpan dalam vesikel sekretori sampai sinyal glukosa dari berbagai sel tubuh ditangkap oleh reseptor sel  $\beta$  (Wilcox, 2005).

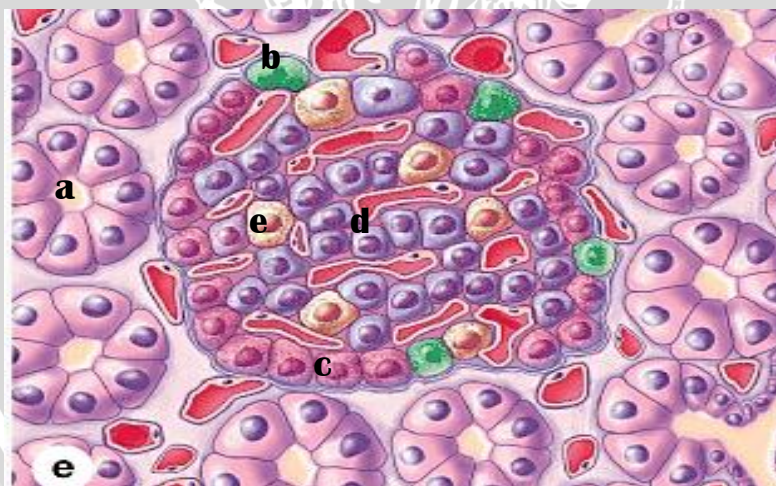
### 2.7 Peran IL-1 $\beta$ dalam resistensi insulin dan kerusakan pulau Langerhans pankreas

Pulau Langerhans merupakan kumpulan atau *cluster* dari beberapa sel endokrin yang berada dalam organ pankreas vertebrata dan berfungsi menghasilkan beberapa hormon. Pulau Langerhans vertebrata terdiri dari beberapa jenis sel diantaranya sel  $\beta$  penghasil insulin, sel  $\alpha$  penghasil glukagon, sel  $\delta$  penghasil somatostatin sel PP penghasil *pancreatic polypeptide* dan epsilon penghasil ghrelin (gambar 2.1) dan (gambar 2.2). Sekitar 5% dari keseluruhan pulau Langerhans terdiri dari sel  $\delta$  dan 80% terdiri dari sel  $\beta$ . sel  $\delta$  biasanya terletak di bagian ujung pulau Langerhans (panah hitam) sedangkan sel  $\beta$  terletak

di bagian inti (gambar 2.1) dan (gambar 2.2). Sel  $\delta$  memiliki diameter sekitar 320 nm. Isi dari sel  $\delta$  terdiri dari granulasi yang sangat halus (Kuehnel, 2003).



**Gambar 2.1** Gambaran histologi normal pulau langerhans pankreas ruminansia; (1) sel  $\alpha$ , (2) sel-sel asinar, (3) sel  $\beta$  (pewarnaan Masson) (Bacha, 2000).



**Gambar 2.2** Topografi histologi pulau Langerhans pankreas tikus; (a) sel asinar, (b) sel PP, (c) sel  $\alpha$ , (d) sel  $\beta$ , (e) sel  $\delta$  (Junquiera, 2010).

Karakteristik kerusakan pulau Langerhans pankreas akibat diet aterogenik dan resistensi insulin pada hewan model tikus diantaranya atrofi pulau Langerhans, hipertropi pada sel-sel  $\beta$ , amyloidosis disertai kematian sel-sel,

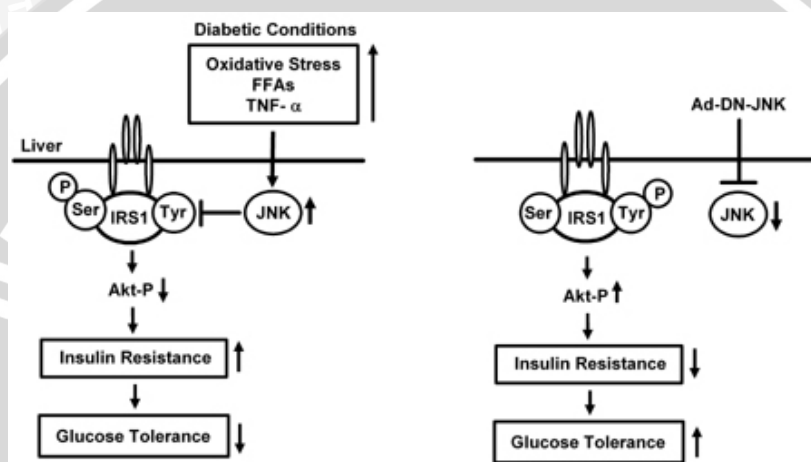


vakuolasi pada sel-sel  $\beta$  dan berkurangnya granulasi insulin pada pewarnaan immunohistokimia, keadaan lanjut memperlihatkan infiltrasi jaringan ikat dan juga adanya sel-sel inflamasi (Lei *et al.*, 2001; Üçkaya *et al.*, 2005).

Resistensi insulin didefinisikan oleh Wilcox (2005) sebagai keadaan dimana kadar insulin mengalami peningkatan akibat terganggunya sensitivitas jaringan terhadap insulin yang diperantarai oleh glukosa. Beberapa mekanisme yang menyebabkan resistensi insulin diantaranya mekanisme *down-regulasi* yaitu penurunan jumlah reseptor molekul hingga menimbulkan mekanisme *feed back negative*, defisiensi atau polimorfisme genetik dari fosforilasi reseptor tirosin insulin, protein IRS atau PIP-3 kinase (*phosphoinositide 3-kinases*), dan abnormalitas fungsi GLUT 4 (*glucose transporter-4*) (Wilcox, 2005).

Peningkatan lemak pada organ visceral akan berdampak terhadap resistensi insulin. Hubungan ini disebabkan oleh peningkatan aktivitas lipolitik dari lemak visceral dengan peningkatan *free fatty acid* (FFA) sebagai jembatan utama yang menyebabkan resistensi insulin hepar dan sistemik yaitu resistensi insulin pada muskulus (Maiorana, 2007). Ketika penyimpanan adiposit melebihi kapasitasnya lipid akan menuju muskulus dan juga mengalami kemungkinan menuju sel  $\beta$  pankreas. Deposit lipid yang mengalami ektopik akan memungkinkan terjadinya lipotoksisitas. Sitokin proinflamasi yang berperan dalam penghambatan sinyalisasi insulin adalah IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 dan IFN *gamma*, yang bekerja pada autokrin dan parakrin untuk melakukan inhibisi dalam proses sinyaling insulin pada perifer dan makrofag (Schenk *et al.*, 2008).

Inhibisi dilakukan oleh FFA yang menginduksi produksi JNK (*jc-Jun N-terminal kinase*) yang akan melakukan delesi pada fosforilasi tirosin sehingga pembentukan IRS-1 terhambat dan aktivitas dari GLUT 4 (*Glucose transporter 4*) tereduksi sehingga tidak ada ikatan antara reseptor insulin membran dengan IRS-1 dan insulin tidak terabsorpsi ke dalam sel (Gambar 2.3) (Kaneto *et al.*, 2004).



**Gambar 2.3** Efek jalur JNK pada resistensi insulin. (Kaneto *et al.*, 2004).

Menurut Emanuelli *et al.* (2004) peningkatan konsentrasi IL-1 $\beta$  dalam sel  $\beta$  pankreas akan menstimulasi ekspresi SOCS-3 yang mempunyai efek antagonis terhadap fosforilasi reseptor insulin dan fosforilasi IRS. Efek penghambatan IL-1 $\beta$  berkaitan dengan penurunan aktivitas dari IRS-1 dan ekspresi dari GLUT-4. Peningkatan IL-1 akan memediasi peningkatan IL-6 yang juga berkontribusi dalam inhibisi ekspresi dari IRS-1 kondisi ini akan memicu perubahan ekspresi dari IRS-2. Peningkatan IL-1 $\beta$  juga akan memediasi peningkatan produksi dari protein kinase MAPKs, ERK, JNK, dan p38MAPK dalam sel otot dan sel adiposit yang berdampak terhadap penurunan ekspresi protein GLUT-4 yang berperan

dalam sinyalisasi insulin saat uptake glukosa mengalami peningkatan (Jager *et al.*, 2007).

Peningkatan permintaan produksi insulin karena terjadinya resistensi insulin akan mengakibatkan sel-sel *endoplasmic reticulum* (ER) bekerja sangat aktif pada sel  $\beta$  pankreas, hal ini memicu peningkatan kerentanan ER stressor yang memediasi *signals mediating glucose* yang memicu gangguan fungsi dan kematian sel (Ozcan *et al.*, 2004). Gangguan disfungsi hingga kematian sel diawali dengan menurunnya sintesis sel oleh manifestasi ER stressor yang akan memicu terjadinya fosforilasi subunit *translation initiation factor 2* (eIF2 $\alpha$ ) oleh *pancreatic ER kinase* (PERK) yang akan memediasi penurunan translasi protein (Majumder *et al.*, 2012). Penurunan translasi protein memperlambat perbanyakan sel dan memicu aktivasi dari *caspase death receptor* yang melakukan sinyalisasi terhadap sel untuk melakukan kematian sel (Holcik and Mahum, 2005).

### 2.8 Daun Kelor (*Moringa Oleifera Lam.*)

Selama sepuluh tahun terakhir *Moringa oleifera* sebagai salah satu tanaman tropis mempunyai potensi yang menjajikan sebagai tanaman yang mempunyai nutrisi sekaligus dijadikan sumber ekonomi tinggi di beberapa negara berkembang. Daun dari *Moringa oleifera* mudah sekali tumbuh dan kaya akan protein, mineral dan vitamin (Noamesi, 2010).

Tanaman *Moringa oleifera* dimanfaatkan diseluruh dunia sebagai pemenuhan gizi dan sebagai obat, dan kegunaan dibidang industri. Hampir setiap bagian dari tanaman kelor memiliki nilai gizi yang tinggi (Tabel 2.2). Di India

biji, daun, dan akar digunakan sebagai bahan makanan baik dalam kondisi segar maupun kalengan (Noamesi, 2010).

Menurut Kasolo *et al.* (2011), tanaman kelor *Moringa Oleifera* diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae (Tanaman)
Divisi	: Magnoliphyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas	: Magnoliopsida (berkeping dua / dikotil)
Sub kelas	: Dilleniidae
Ordo (bangsa)	: Brassicales
Familia (suku)	: Moringaceae
Genus (marga)	: Moringa
Spesies (jenis)	: <i>Moringa oleifera</i>

**Tabel 2.2** Kandungan yang bermanfaat pada *Moringa oleifera*

Komposisi	Bagian tanaman
Lignin/ selulosa	Tangkai
Alcohol	Tangkai
Hormone	Daun
Bioflavonoid	Daun, bunga, dan tangkai
Asam arachidonat	Benih dan daun
Asam oleat	Benih dan daun
Asam linoleat	Benih dan daun
Asam linolenik	Benih
Pterigospermin	Bunga

Sumber : (Noamesi, 2010).

### 2.8.1 Senyawa fitokimia *Moringa oleifera* Lam.

Analisis fitokimia menunjukkan bahwa *Moringa oleifera lam.* Mempunyai kandungan senyawa fitokimia diantaranya asam askorbat dan fenol diantaranya katekin, epikatekin, asam ferulik ,asam ellagic dan myricetin Kandungan senyawa

kimia yang bersifat antioksidan pada *Moringa oleifera* diduga mempunyai efek antiinflamatori (Sinha *et al.*, 2011).

Uji antiinflamatori yang dilakukan dengan menggunakan telapak kaki dari tikus yang diinduksi carrageenan membuktikan bahwa ekstrak akar *Moringa oleifera* dapat menghambat proses inflamasi sampai dengan 85 persen. Carrageenan merupakan linear sulfat polisakarida produk makanan yang diteliti dapat menginduksi respon inflamasi epidermis dan dermis pada telapak kaki tikus (Goyal *et al.*, 2007). Telah dilaporkan senyawa flavonoid yang diisolasi dari beberapa tanaman obat terbukti mempunyai efek antiinflamasi (Peluso, 2006).

### **2.9 Mekanisme Inhibisi dan proteksi Flavonoid**

Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang terkandung dalam tanaman dan mempunyai kerangka diphenylpropane (C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>C<sub>6</sub>) meliputi monomer flavanols, flavanones, flavones, dan flavonols (Gerritsen *et al.*, 1995). Studi Kim *et al.* (2007) secara spesifik senyawa quercetin, epigenin, luteolin yang terkandung di dalam bioflavonoid secara kompleks dapat menurunkan ekspresi IL-1 $\beta$  dan IFN-*gamma* melalui hambatan terhadap aktivitas NF-*κ*B dan mekanisme ini terjadi melalui induksi NO *synthase messenger* RNA. NO (*nitric oxide*) berperan dalam elastisitas endotel dimana semakin tinggi kadar NO maka kemampuan endotel melakukan vasodilatasi semakin tinggi (Van Hove *et al.*, 2009).

Quercetin dari flavonoid juga dapat menghambat aktivitas IL-1 $\beta$  dengan melakukan inhibisi pada molekul adhesi ICAM-1 (Ying *et al.*, 2009). Studi

Ching-Chow *et al.* (2004) menggunakan 3 macam flavonol (kaempferol, quercetin, dan myricetin) dan 6 macam flavonol (flavone, chrysin, apigenin, luteolin, baicalein, dan baicalin) menunjukkan kaempferol dan chrysin mempunyai kemampuan melakukan hambatan ekspresi sitokin TNF- $\alpha$  dan ICAM 1 melalui c-jun mRNA sedangkan luteolin dan apigenin secara lebih kompleks dapat melakukan hambatan pada aktivitas ERK, p38, dan JNK. Flavonol Epigallocatechin-3-gallate juga mempunyai efek hambatan terhadap aktivitas sitokin proinflamatori dengan melakukan bloking ekspresi NF $\kappa$ B melalui jalur IKK (Yang *et al.*, 2001).

Menurut Manthey *et al.* (2001) flavonoid secara poten menghambat sinyal molekul prostaglandin, yang memediasi aktivasi dari sitokin proinflamasi. Penelitian telah menunjukkan bahwa efek ini disebabkan oleh penghambatan flavonoid terhadap enzim yang terlibat dalam biosintesis prostaglandin Cyclooxygenase (COX) yang menginduksi secara kuat sitokin proinflamatori dimana gen ekspresinya diatur oleh NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa B*) (Ching-Chow *et al.*, 2004).

## BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

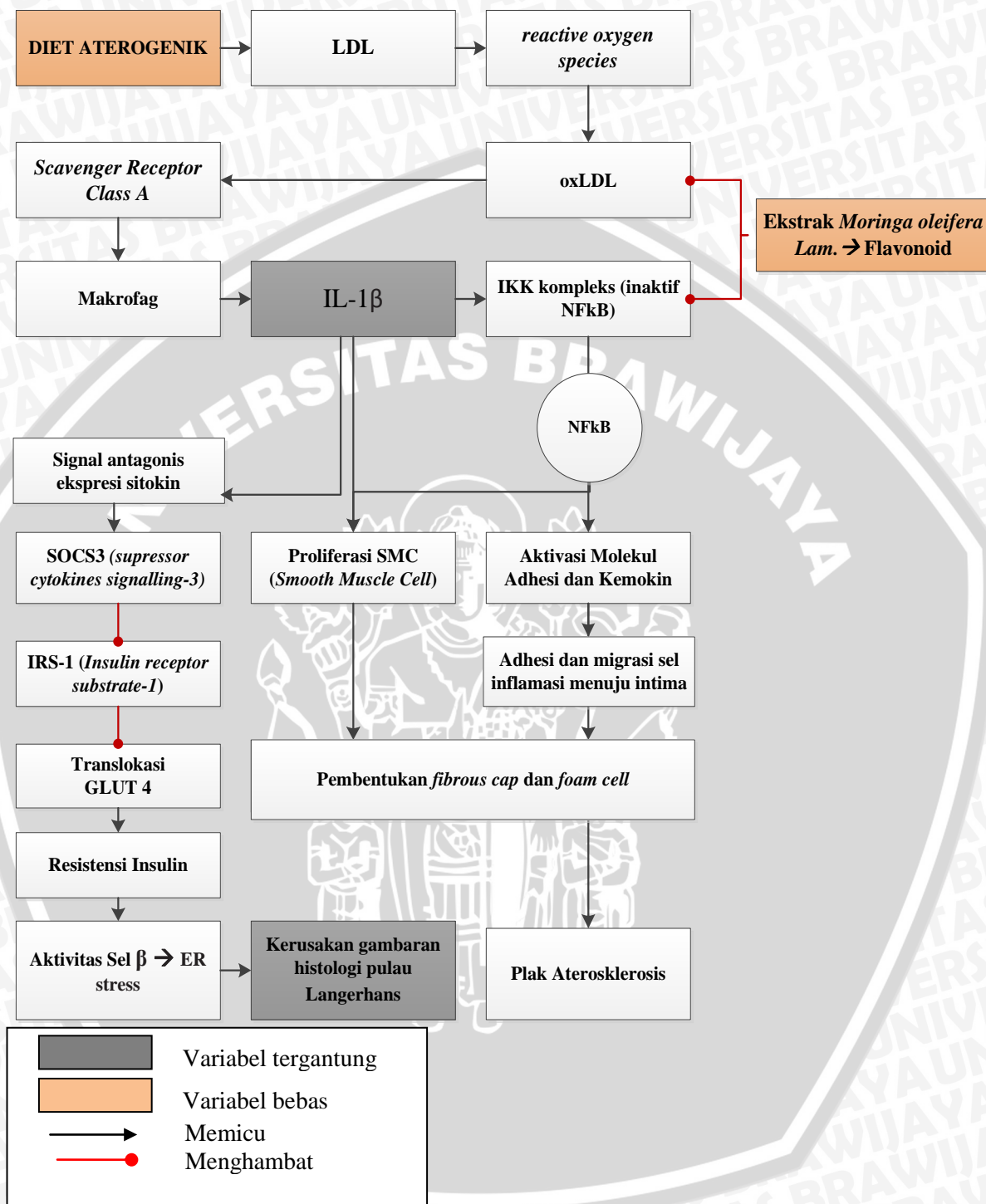
### 3.1 Kerangka Konsep

Pemberian diet aterogenik menimbulkan akumulasi LDL dalam darah. Peningkatan LDL akan memicu produksi dari ROS, produksi ROS akan memediasi terjadinya modifikasi LDL menjadi oxLDL (*oxidized* LDL). Tingginya modifikasi oxLDL akan menimbulkan aktivasi dari *scavenger receptor class A* (Sr-A) dan memicu aktivitas fagositosis oleh makrofag. OxLDL juga akan memediasi ekspresi sinyal ekstraseluler dari molekul adhesi dan kemokin. Tingginya aktivitas makrofag akan berkorelasi terhadap peningkatan produksi sitokin proinflamasi IL-1 $\beta$ . Aktivitas dari sitokin proinflamasi IL-1 $\beta$  akan memicu ekspresi dari NF- $\kappa$ B melalui jalur aktivasi dari I $\kappa$ B kinase (IKK) kompleks. Keadaan ini juga berdampak terhadap ekspresi dari gen inflamasi diantaranya sitokin proinflamasi, molekul adhesi, dan kemokin hingga menstimulasi perubahan LDL menjadi inflamatori lipid yang dipicu oleh perlekatan dan juga migrasi sel-sel inflamasi ke subendotel untuk memasuki intima. Akumulasi sel inflamasi di endotel akan membentuk penebalan di dinding pembuluh darah selain itu keberadaan IL-1  $\beta$  dan aktivasi dari NF- $\kappa$ B juga memodulasi proliferasi dan migrasi *smooth muscle cell* (SMC) menuju bagian intima membentuk *fibrous cap*. Akumulasi masif kolesterol dan aktivitas sel-sel inflamasi bekerjasama membentuk *foam cell*, hingga terjadi formasi plak di intima. Jika plak aterosklerosis terpapar oleh ROS maka akan memicu rupturnya plak dan memediasi terjadinya stenosis pada pembuluh darah kecil hingga menimbulkan beberapa gangguan sistem kardiovaskuler diantaranya *infark miokard* hingga

serangan jantung yang berakibat kematian. Selain itu peningkatan IL-1 $\beta$  akan menginduksi ekspresi dari SOCS3 (*supressor cytokine signaling-3*) yang menghambat transport *uptake* insulin ke sel muskulus dan sel adiposit dengan menurunkan sinyalisasi GLUT 4 melalui hambatan regulasi IRS-1, sehingga memicu terjadinya resistensi insulin. Resistensi insulin menimbulkan kerusakan pulau Langerhans yang berperan dalam mensintesis pembentukan insulin dalam pankreas dengan meningkatkan stress pada *endoplasmic reticulum* akibat peningkatan permintaan insulin dari sel muskulus dan sel lemak.

Ekstrak air *Moringa oleifera Lam.* yang memiliki kandungan antioksidan flavonoid akan menurunkan kadar IL- $\beta$  melalui hambatan terhadap produksi dari ROS (*reactive oxygen species*) yang terbentuk saat LDL meningkat akibat pemberian diet aterogenik. Ketika ROS dalam keadaan rendah maka derajat modifikasi LDL menjadi oxLDL menurun, *scavenger receptor* tetap dalam keadaan inaktif dan makrofag tidak melakukan migrasi menuju endotel. Hambatan flavonoid juga terjadi pada aktivitas inflamatori kinase IKK kompleks yang berperan dalam meregulasi aktivasi dari NF- $\kappa$ b. NF- $\kappa$ b merupakan protein faktor transkripsi gen-gen inflamasi yang berperan penuh terhadap respon inflamasi melalui gen penyandi sitokin proinflamasi, molekul adhesi, dan kemokin. Kedua kondisi ini akan berdampak terhadap penurunan aktivitas respon inflamasi vaskuler dan hal ini akan menghambat terjadinya kondisi aterosklerosis. Ketika IL-1 $\beta$  menurun tidak terjadi aktivitas antiinflamatori (SOCS) dan resistensi insulin tidak terjadi.





Gambar 3.1 Kerangka konsep

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah ada, maka hipotesis yang dapat diajukan adalah sebagai berikut:

1. Ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera Lam.*) dapat menurunkan sitokin proinflamatori IL-1 $\beta$  pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang diberikan perlakuan diet aterogenik
2. Ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera Lam.*) dapat menurunkan kerusakan struktural dan degenerasi sel pulau Langerhans pankreas pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang diberikan perlakuan diet aterogenik.



## BAB 4 METODE PENELITIAN

### 4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April - Juni 2013 di beberapa Laboratorium yaitu perawatan hewan coba dan perlakuan terhadap hewan coba dilaksanakan di Klinik Hewan Pendidikan Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya, pembedahan dan pengukuran kadar IL-1 $\beta$  dilaksanakan di Laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, dan pembuatan preparat histopatologi dilaksanakan di Laboratorium histologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

### 4.2 Alat dan Bahan Penelitian

#### 4.2.1 Perawatan Hewan coba

Kandang pemeliharaan individu dengan ukuran 31 x 18,5 x 12,5 cm, tempat makan dan minum tikus.

#### 4.2.2 Pembuatan ransum diet aterogenik

Timbangan digital (Weston *digiscale*<sup>TM</sup>), neraca analitik (HWH<sup>TM</sup>), pengaduk, gelas ukur, *blender*.

#### 4.2.4 Pembuatan ekstrak *Moringa oleifera* Lam.

Oven, *blender*, timbangan, gelas Erlenmeyer, corong gelas, kertas saring whatman, evaporator, pendingin spiral, labu penampung hasil ekstraksi, *water bath* (Memmert<sup>TM</sup>), bahan yang digunakan adalah bubuk simplisia daun kelor.

#### 4.2.5 Alat pemberian ekstrak kepada hewan coba

*Eppendorf tube*, Sonde lambung (*orogastric tube*)

#### 4.2.6 Pembedahan Tikus

Gunting bedah, pinset, jarum pentul, sterofoam, penggaris, kertas label, tutup, vakutainer, alkohol dan media preservasi formalin.

#### 4.2.7 Pemeriksaan ekspresi IL-1 $\beta$ dengan ELISA

*Multichannel pipette* (Eppendorf Research<sup>TM</sup>), *ELISA reader* (WWT<sup>TM</sup>), Sentrifuge, *vortex mixer*, mikropipet, *blue tip*, *yellow tip*, serum darah tikus, PBS (*phosphate buffered saline*), BSA (*bovine serum albumin*), tween, antibody IL-1 $\beta$ , antibody sekunder (*anti-Rat KPL<sup>TM</sup>*), *coating buffer*, HCL 1N.

### 4.3 Tahapan Penelitian

#### 4.3.1 Penetapan sampel penelitian

Kriteria inklusi hewan coba sebagai berikut :

- a. Tikus putih *Rattus norvegicus* strain wistar
- b. Jantan
- c. Umur 8 minggu
- d. Berat badan 120 sampai dengan 172 gram (Lampiran 6)
- e. Sehat (berambut cerah, aktivitas baik, tidak ada abnormalitas anatomis, nafsu makan baik).
- f. Belum pernah digunakan penelitian

Kriteria eksklusi hewan coba sebagai berikut :

- a. Hewan mengalami sakit saat masa adaptasi berlangsung.
- b. Hewan mengalami sakit pada saat penelitian berlangsung.
- c. Hewan mengalami kematian pada saat penelitian berlangsung.

Hewan coba diaklimatisasi selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium dan dilakukan pengukuran berat badan untuk kemudian diuji keragamannya dan sebagai sampel telah dinyatakan homogen. Dalam penelitian ini menggunakan 30 ekor hewan coba, dibagi dalam 5 kelompok yaitu kelompok kontrol positif, kelompok kontrol negatif dan 3 kelompok perlakuan. Jumlah hewan coba yang diperlukan untuk masing-masing perlakuan dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut

$$\begin{aligned}p(n-1) &\geq 15 \\5(n-1) &\geq 15 \\5n-5 &\geq 15 \\5n &\geq 20 \\n &\geq 4\end{aligned}$$

(Kusriningrum,2010)

Keterangan :

p = Jumlah perlakuan yaitu pemberian ekstrak *Moringa oleifera Lam.*

n= Jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk perlakuan sejumlah 5 kelompok diperlukan jumlah sampel atau ulangan minimal 4 kali dalam setiap kelompok. Dalam penelitian ini menggunakan jumlah sampel 30 ekor.

#### 4.3.2 Penetapan dosis ekstrak *Moringa oleifera Lam.*

Perlakuan ekstrak *Moringa oleifera Lam* dengan dosis bertingkat yaitu 150 mg/kg BB, 300 mg/kg BB, dan 600 mg/kg BB dosis rujukan yang diambil berdasarkan penelitian (Jain *et al.*, 2010) untuk mengetahui penurunan hiperlipidemia pada tikus menggunakan ekstrak metanol *Moringa oleifera Lam.*

Berdasarkan penghitungan berat badan maka didapatkan dosis sebesar 0,034 ml untuk K3, 0,06 ml untuk K4, dan 0,115 ml untuk K5. Diberikan secara oral kepada tikus (Lampiran 5).

#### 4.3.3 Pemberian diet aterogenik dan diet normal

Pemberian diet aterogenik dimaksudkan untuk menginduksi kondisi aterogenik. Penyediaan diet aterogenik sebesar 40 gram (Murwani *et al.*, 2006). Diet aterogenik dan diet normal yang dikonsumsi sebesar 27 gram setiap hari per tikus (lampiran 8). Komposisi diet aterogenik dapat dilihat dalam tabel 4.1 dan komposisi diet normal dalam tabel 4.2.

**Tabel 4.1** Komposisi Bahan Diet Aterogenik setiap 27 gram

Bahan	Persentase (%)	Berat (gram)
Comfeed PARS	50	13,8 gram
Tepung terigu	25	7 gram
Kuning telur bebek	5	1,38 gram
Lemak kambing	10	2,76 gram
Minyak kelapa	1	0,0276 gram
Minyak babi	8.9	2,67 gram
Asam kolat	0.1	0,015 gram
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>27 gram</b>

Sumber : (Rahmah, 2010)

**Tabel 4.2** Komposisi Bahan diet normal setiap 27 gram

Bahan	Persentase (%)	Berat (gram)
Konsentrat		
Comfeed PARS	53	14,31
Tepung terigu	23,5	6,4
Air	23,5	6,4
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>27 gram</b>

Sumber : (Rahmah, 2010)

Diet aterogenik memiliki kandungan lemak dan karbohidrat yang tinggi dan memicu peningkatan sitokin proinflamasi (Vergnes *et al.*, 2003) (tabel 4.3).

**Tabel 4.3** Kandungan gizi dalam diet aterogenik persaji (27 gram)

Kandungan zat gizi	Jumlah	Jumlah dalam %
Energi	146,82 kkal	-
Karbohidrat	5,7 gram	47%
Lemak	2,73 gram	23%
Protein	1,59 gram	13,25%

Sumber : (Rahmah, 2010).

#### 4.3.4 Rancangan penelitian

Menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), penelitian merupakan rancangan desain eksperimental murni atau *true experimental design*, dengan *post test control group design*. Hewan coba dibagi menjadi lima kelompok, terdiri dari kelompok kontrol negatif (K1), kelompok kontrol positif (K2) dan kelompok perlakuan (K3, K4, K5) keterangan terdapat pada tabel 4.4.

**Tabel 4.4** Rancangan kelompok penelitian

Kelompok	Keterangan
K1(-)	Tikus diberi pakan normal dan minum <i>ad libitum</i> selama delapan minggu
K2(+)	Tikus diberi diet aterogenik 27 gram selama 8 minggu tanpa pemberian ekstrak <i>Moringa oleifera Lam.</i>
K3	Tikus diberi diet aterogenik 27 gram dan perlakuan ekstrak daun kelor ( <i>Moringa oleifera Lam.</i> ) dengan dosis 0,034 ml/ekor selama 8 minggu.
K4	Tikus diberi diet aterogenik 27 gram dan perlakuan ekstrak daun kelor ( <i>Moringa oleifera Lam.</i> ) dengan dosis 0,06 ml/ekor selama 8 minggu.
K5	Tikus diberi diet aterogenik 27 gram dan perlakuan ekstrak daun kelor ( <i>Moringa oleifera Lam.</i> ) dengan dosis 0,115 ml/ekor selama 8 minggu.

#### 4.3.5 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dari penelitian ini yaitu:

Variabel bebas : Pemberian diet aterogenik dan penambahan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera Lam.*) dengan dosis 0,034 ml, 0,06 ml, dan 0,115 ml/ekor diberikan secara oral menggunakan sonde lambung.

Variabel tergantung : kadar sitokin IL-1 $\beta$  dan gambaran histopatologi pulau Langerhans pankreas.

Variabel kendali : Jenis tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar, berjenis kelamin jantan, berumur 8 minggu, dengan berat badan 120-172 gram, pemberian diet aterogenik, dan kondisi lingkungan kandang.

#### 4.3.6 Analisis Statistika kadar IL-1 $\beta$

Pada percobaan ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL).

Analisa kadar IL-1 $\beta$  menggunakan *one way ANOVA (Analysis Of Variance)* dengan menggunakan program SPSS 18 *for windows* taraf kepercayaan sebesar 95% dengan ( $\alpha=0,05$ ).

#### 4.3.7 Analisis histopatologi pulau Langerhans pankreas.

Data gambaran kerusakan pulau Langerhans pankreas dianalisis secara deskriptif dengan kriteria kerusakan berupa degenerasi sel (perubahan struktur dan ukuran sel) (Jones *et al.*, 2010).



#### 4.4 Prosedur Kerja

##### 4.4.1 Perawatan hewan coba

- 1) Tikus dibagi dalam 5 kelompok perlakuan secara acak.
- 2) Tikus di adaptasikan dalam kandang individu selama 7 hari (Anonim, 2005) sebelum dilakukan perlakuan.
- 3) Tikus diberi minum *ad libitum* dan pakan selama masa adaptasi.
- 4) Tikus diberi perlakuan setelah masa adaptasi sesuai dengan kelompok perlakuan.

##### 4.4.2 Pembuatan diet normal dan aterogenik

- 1) Komposisi diet aterogenik dan diet normal ditimbang menggunakan timbangan analitik (tabel 4.1 dan tabel 4.2).
- 2) Setelah ditimbang komposisi diet aterogenik dan diet normal dicampur sesuai dengan kebutuhan jumlah pakan yang diperlukan setiap hari.

##### 4.4.3 Pembuatan ekstrak *Moringa oleifera Lam.*

- 1) Daun kelor (*Moringa oleifera Lam.*) bubuk simplisia dikoleksi dari UPT Materica Medica Batu. Daun kelor *Moringa oleifera Lam.* dikoleksi berumur sedang, tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda dengan karakteristik warna hijau muda tersebar dipermukaannya, mempunyai helai berbentuk bulat telur, dan mempunyai *vein* (urat daun) yang belum mengeras.
- 2) Hasil koleksi dicuci dengan air mengalir, dikeringkan dengan pengeringan alami menggunakan sinar matahari.
- 3) Daun kelor yang kering di hancurkan menggunakan *blender* hingga menjadi bubuk daun kelor.

- 4) bubuk daun kelor simplisia ditimbang 100 gram menggunakan timbangan analitik ditambahkan akuades dalam kondisi steril sebanyak 1 liter kemudian dikocok selama 30 menit, dibiarkan sampai mengendap selama 24 jam.
- 5) Hasil perendaman disaring menggunakan kertas Whatman no.1.
- 6) Evaporator ditempatkan dengan kemiringan 30-40°, hasil filtrasi *Moringa oleifera Lam.* dimasukkan ke dalam labu ekstraksi kemudian labu ekstraksi ditempatkan terendam oleh akuades pada *waterbath* dengan suhu 60-70°C. Didapatkan hasil evaporasi berupa cairan kental. Pada penelitian ini hasil evaporasi dianggap mempunyai konsentrasi 100% (Chaouche *et al.*, 2012).

#### 4.4.4 Pemberian ekstrak

- 1) Ekstrak ditimbang menggunakan timbangan analitik sesuai dengan dosis yang ditentukan setiap ekor setiap hari
- 2) Ekstrak diberikan kepada hewan coba secara oral menggunakan *orogastric tube* (sonde lambung).

#### 4.4.5 Pembuatan slide histologi (Pakurar *and* bigbee, 2004 ; Kiernan, 1990).

- 1) Tikus di *euthanasia* dengan cara dislokasi leher (*dislocatio os cervical*) selanjutnya dilakukan pembedahan dan isolasi organ pankreas.
- 2) Organ yang telah diisolasi dipotong-potong dengan ukuran 1x1 cm didalam cairan fisiologis (NaCl 0.9%) untuk mendapatkan ukuran yang lebih kecil. Hal ini dilakukan agar cairan fiksasi dapat masuk kedalam jaringan dengan mudah dan baik.
- 3) Hasil potongan jaringan difiksasi dengan menggunakan larutan fiksatif paraformaldehyde 10% selama 24 jam.

- 4) Dehidrasi jaringan dengan menggunakan alkohol bertingkat 70%, 80 %, 90% dan 95% selama masing-masing 45 menit, dan alkohol 100% sebanyak 3 kali pengulangan selama masing-masing 45 menit.
- 5) *Clearing* jaringan dengan cara direndam menggunakan *clearing agent* xylol I, xylol II, xylol III dan xylol IV masing-masing selama 30 menit.
- 6) Infiltrasi paraffin, jaringan dimasukkan dalam paraffin cair I, paraffin cair II, dan paraffin cair III selama masing –masing 1 jam di dalam oven. Selanjutnya didiamkan selama 24 jam.
- 7) *Embedding* (perendaman dan pencetakan) dengan memasukkan paraffin ke dalam cetakan sampai dengan setengah penuh, kemudian potongan jaringan dimasukkan, selanjutnya cetakan ditambah dengan paraffin cair hingga penuh yang kemudian dilabel. Proses pencetakan dilakukan dengan menggunakan *tissue embedding console* sediaan selanjutnya dibekukan dan didinginkan selama 2 jam sebelum dilakukan pemotongan dengan mikrotom.
- 8) *Slicing* dan *mounting* dengan menggunakan *rotary* mikrotom jaringan diiris dengan ketebalan 4-5 mikrometer dan direkatkan pada *glass* objek menggunakan gelatin atau dengan melewati diatas api hingga paraffin melekat kuat dengan *glass* objek. Preparat yang sudah dilakukan *sectioning* disimpan pada inkubator dengan suhu 37<sup>0</sup> C selama semalam.
- 9) *Staining* dengan Hematoxylin eosin dengan langkah (deparaffinasi menggunakan xilol, rehidrasi menggunakan alkohol dengan gradasi konsentrasi yang menurun dari 100% selama 3 kali 95%-90%-80%-70%,

masing-masing selama 3 menit, sediaan dicuci menggunakan air mengalir selama 15 menit dan dilanjutkan dengan air aquades selama 5 menit, *staining* dengan hematoxylin selama 15 menit dicuci dengan air mengalir selama 15 menit, *staining* dengan eosin selama 10 menit, dicuci dengan air mengalir selama 15 menit, dicuci dengan air mengalir selama 10 menit, dan air aquades selama 5 menit, selanjutnya dehidrasi dengan alkohol bertingkat dan 70%-80%-90%-95% masing-masing selama 5 menit dan 100% dengan 3 kali pengulangan masing-masing selama 15 menit selanjutnya dilakukan *clearing* dengan menggunakan xilol I, II, III selama masing-masing 15 menit dan ditutup dengan *cover glass*.

#### 4.4.6 Pengamatan Histologi

- 1) Preparat histologi jaringan pankreas diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali.
- 2) Pengambilan gambaran histologis dengan menggunakan kamera. Kriteria kerusakan berupa perubahan struktural dan degenerasi sel (Jones *et al.*, 2010).

#### 4.4.7 Pembuatan serum sampel

- 1) Darah sejumlah 5 ml yang diambil dari hewan coba diletakkan di dalam spuit.
- 2) Diamkan selama 15 menit sampai 20 menit agar serum darah memisah.
- 3) Disentrifugasi dalam 3000 rpm selama 10 menit.

#### 4.4.8 Pemeriksaan IL-1 $\beta$ (Santoso, 2009).

- 1) Proses *coating* dengan antigen pada *microplate polyvinil*, dengan perbandingan antigen dan *coating buffer* 1  $\mu$ l :20  $\mu$ l.
- 2) Diinkubasi dalam waktu 24 jam pada suhu 4 $^{\circ}$  C, dilanjutkan dicuci dengan PBS (*phospat buffer saline*) tween 0,2% sebanyak 3x3 menit.
- 3) *Blocking* dengan BSA (*Bovine serum albumin*) 1% selama 30 menit lalu dibuang, dilanjutkan pencucian dengan PBS tween 0,2 % 3x3 menit,
- 4) Ditambahkan antibodi primer IL-1  $\beta$  sebanyak 50  $\mu$ l dengan perbandingan 1  $\mu$ l :1000  $\mu$ l didiamkan selama 2 jam pada suhu ruang, dilanjutkan pencucian dengan TBS tween 3x3 menit,
- 5) Diinkubasi dengan antibodi sekunder *anti-Rat KPL* dengan perbandingan 1  $\mu$ l :2000  $\mu$ l dalam suhu ruang, dicuci dengan PBS tween selama 3x3 menit.
- 6) Diinkubasi dalam enzim sAHRP (*Streptavidin horseradish peroxidase*) dengan perbandingan 1  $\mu$ l :2000  $\mu$ l selama 1 jam pada suhu ruang, cuci dengan PBS tween 0,2% 3x3 menit, inkubasi dalam substrat TMB (*tetra-methylene blue*) selama 30 menit dalam ruang gelap, tambahkan *stop solution* 1N HCL selama 10 menit, dan langkah terakhir adalah dibaca menggunakan ELISA *reader*.
- 7) Nilai kadar sampel dapat dibaca menggunakan ELISA *reader* WWT pada panjang gelombang 450 nm, dan hasil kadar IL-1 $\beta$  akan terlihat dalam tabel konsentrasi dan OD (*optical density*) yang dihasilkan ELISA *reader* selanjutnya hasil absorbansi dilakukan tabulasi menggunakan Ms Excel dan kadar IL-1 $\beta$  dapat dilihat dalam *dose response curve*.

## BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

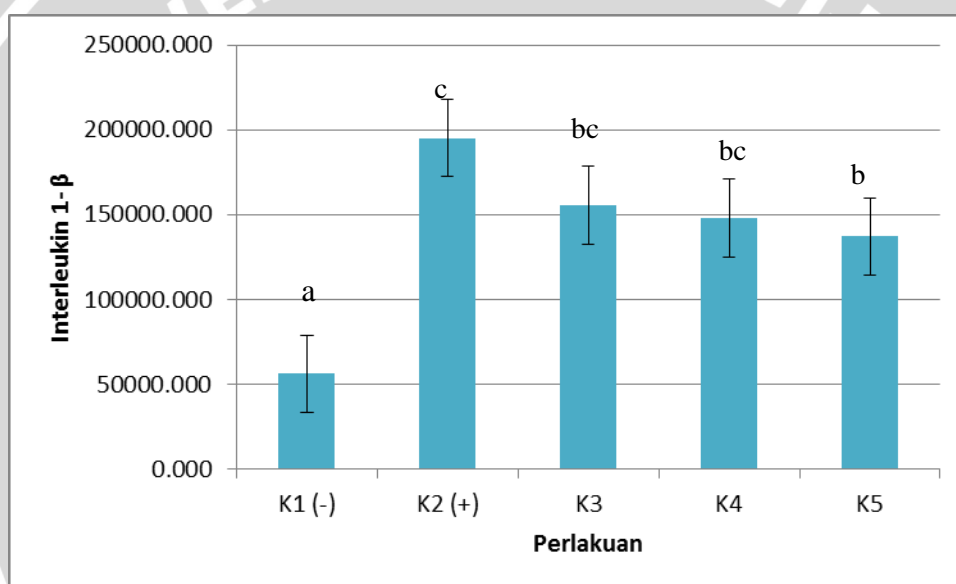
### 5.1 Pengaruh perlakuan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera Lam.*) terhadap kadar IL-1 $\beta$ .

Dalam penelitian ini dilakukan pengukuran kadar IL-1 $\beta$  dari tikus *Rattus norvegicus* yang dengan perlakuan diet aterogenik selama 8 minggu dan pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera Lam.*) melalui metode ELISA. Pemberian diet aterogenik selama 8 minggu dimaksudkan untuk menginduksi kondisi aterosklerosis pada tikus. Sampel penelitian menggunakan hewan coba tikus yang dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif dengan pemberian diet normal, kontrol positif dengan perlakuan diet aterogenik, dan kelompok perlakuan adalah hewan coba dengan perlakuan diet aterogenik, disertai pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera Lam.*) dengan dosis 0,034 ml untuk kelompok 3, 0,06 ml untuk kelompok 4, dan 0,115 ml untuk kelompok 5 secara bersamaan dimaksudkan untuk mengetahui kemampuan preventif dari ekstrak daun kelor dalam menghambat terjadinya respon inflamasi pada dinding vaskuler yang merupakan salah satu indikator terjadinya aterosklerosis melalui analisa kadar IL-1 $\beta$ . Hasil kuantifikasi IL-1  $\beta$  dengan metode ELISA *indirect* dan dilakukan analisis menggunakan *One Way ANOVA* didapatkan hasil pengukuran yang signifikan ( $p < 0,05$ ) antar kelompok perlakuan (Tabel 5.1 dan Gambar 5.1) artinya terdapat pengaruh perlakuan ekstrak *Moringa oleifera Lam.* terhadap penurunan kadar IL-1 $\beta$ .

**Tabel 5.1 Hasil kuantifikasi kadar IL-1 $\beta$  pada *Rattus norvegicus* Wistar dengan analisis *oneway* ANOVA**

Perlakuan	N	Mean $\pm$ SD* P (<0.05) kadar IL-1 $\beta$ (pg)
K1(-)	4	56181.750 $\pm$ 6001.764 <sup>a</sup>
K2(+)	4	195045.250 $\pm$ 33832.252 <sup>c</sup>
K3	4	155500.000 $\pm$ 33087.280 <sup>bc</sup>
K4	4	148000.250 $\pm$ 29998.736 <sup>bc</sup>
K5	4	137091.000 $\pm$ 18065.995 <sup>b</sup>

Keterangan : Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan  
N= jumlah *well* (ulangan perlakuan).



**Gambar 5.1** Kadar interleukin 1- $\beta$  pada *Rattus norvegicus* dengan perlakuan diet aterogenik.

Hasil pengujian lanjutan Post Hoc test menunjukkan bahwa kelompok 3 (*M.oleifera* 0,034 ml), dan kelompok 4 (*M.oleifera* 0,06 ml) tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif. Hal ini diduga dikarenakan tidak cukupnya konsentrasi antioksidan yang terkandung dalam dosis kelompok 3 dan 4 untuk melakukan hambatan secara bermakna terhadap penurunan IL-1 $\beta$ . Sedangkan hal

ini berlaku sebaliknya pada kelompok 5 (*M.oleifera* 0,115 ml) berbeda signifikan dengan kontrol positif.

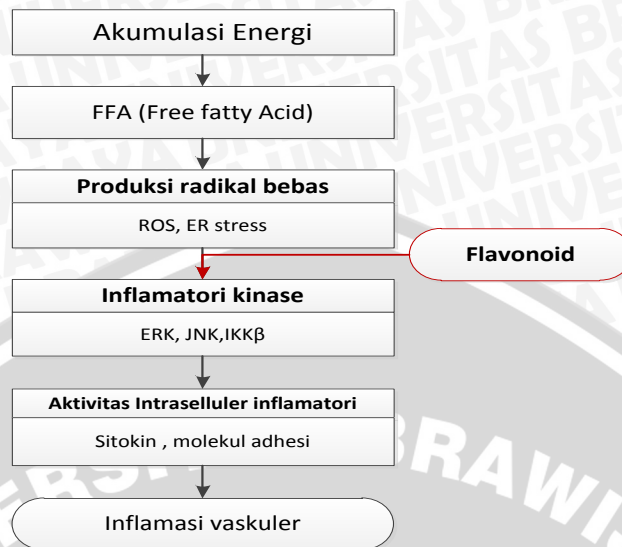
Peningkatan produksi IL-1 $\beta$  pada kelompok kontrol positif disebabkan oleh tingginya akumulasi dari LDL yang diinduksi oleh pemberian diet aterogenik selama 8 minggu. BMI (*body mass index*) merupakan penanda kondisi obesitas yang memicu keadaan aterogenik. Dikatakan Novelli *et al.* (2007) BMI normal pada *Rattus norvegicus* adalah 0,45-0,68 g/cm<sup>2</sup>. Pemberian diet aterogenik selama 8 minggu menunjukkan peningkatan BMI pada K2 (kontrol positif) hingga mencapai 1.64 (lampiran 11) kondisi ini menunjukkan bahwa K2 hewan coba memiliki BMI lebih tinggi dari normal dan kondisi ini memungkinkan atau memiliki kemampuan terbentuknya plak ateroma pada dinding pembuluh darah (Panagiotis *et al.*, 2008).

Jalur proses inflamasi vaskuler dimulai ketika LDL terdeposit di dalam darah, keadaan ini akan menginduksi tingginya aktivitas makrofag akibat aktivasi dari *scavenger receptor A* yang dilepaskan ketika LDL mengalami oksidasi menjadi oxLDL (Minami *et al.*, 2001). Aktivitas dari makrofag akan memicu produksi dari sitokin proinflamasi salah satunya adalah IL-1 $\beta$  aktivasi dari IL-1 $\beta$  akan memediasi aktivasi dari NF-kB melalui I $\kappa$ B kinase (IKK kompleks). Aktivitas IL-1 $\beta$  dan NF-kB bekerja bersama mengontrol ekspresi dari molekul adhesi, kemokin, proliferasi dan migrasi dari *smooth muscle cell*, dan modulasi *remodelling* matriks ekstrasel oleh (MMPs) (Tedgui *and* Mallat, 2006). Induksi molekul adhesi dan kemokin yang dilepaskan oleh signal ekstraseluler endotel memicu perlekatan sel-sel inflamasi pada endotel vaskuler. Hal ini mendorong



rekrutmen dan infiltrasi sel-sel inflamasi menuju intima, keadaan ini disertai dengan proliferasi dan perpindahan SMC (*smooth muscle cell*) dari tunika media menuju tunika intima membentuk lapisan jaringan ikat atau *fibrous cap*. Siklus berulang pada kondisi inflamasi menyebabkan makrofag terakumulasi pada bagian intima (Spagnoli *et al.*, 2007). Selain itu MMPs memicu *remodelling* matriks ekstraseluler pada lesi vaskuler yang dibentuk oleh sel-sel inflamasi dan inflamatori lipid melalui degradasi pada protein ECM (*extracellular membrane*) (Andrea *et al.*, 2007).

Rataan kadar IL-1 $\beta$  menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *Moringa oleifera Lam.* mampu menurunkan kadar seiring dengan dengan peningkatan dosis ekstrak air daun kelor *Moringa oleifera Lam.* (gambar 5.1). Mekanisme hambatan yang dilakukan oleh *Moringa oleifera Lam.* ketika kandungan flavonoid melakukan hambatan pada dua jalur yaitu flavonoid sebagai antioksidan akan melakukan inhibisi pada produksi dari *reactive oxygen species* yang dihasilkan ketika LDL terakumulasi tinggi dalam tubuh. Sehingga ketika ROS mengalami penurunan maka derajat oksidasi LDL juga mengalami penurunan dan *scavenger receptor* tetap dalam keadaan inaktif sehingga tidak melakukan ikatan dengan makrofag dan IL-1 $\beta$  tidak diproduksi (Guabiraba *et al.*, 2010). Jalur kedua adalah ketika flavonoid melakukan hambatan pada aktivitas inflamatori kinase yaitu IKK $\beta$  (IkB $\alpha$  dan IkB $\beta$ ) sehingga kompleks IKK tetap dalam kondisi inaktif dan regulasi gen proinflamasi diantaranya sitokin pro inflamasi, molekul adhesi, kemokin, dan juga *growth factor* tidak terjadi (Gambar 5.2) (Nair *et al.*, 2006).



**Gambar 5.2** Skema inhibisi flavonoid pada aktivitas inflamatori kinase.

Dalam hal ini sejalan dengan penelitian Kim *et al.* (2007) yang menyatakan beberapa senyawa yang terkandung dalam bioflavonoid secara poten dapat menurunkan kadar IL-1  $\beta$ . Dan secara spesifik senyawa flavonoid dapat melakukan inhibisi pada produksi sitokin proinflamatori melalui hambatan pada aktivitas dari inflamatori kinase (Yang *et al.*, 2001) sesuai dengan pernyataan Hirosumi *et al.* (2002) inflamatori kinase diantaranya ERK (*Extracellular regulated signal kinase*), p38 (tumor protein 53), JNK (*c-Jun N-terminal kinases*) dan IKK $\beta$  (IkB $\alpha$  kinase) berperan dalam memodulasi aktivasi dari beberapa marker inflamasi diantaranya molekul adhesi, sitokin, dan kemokin.

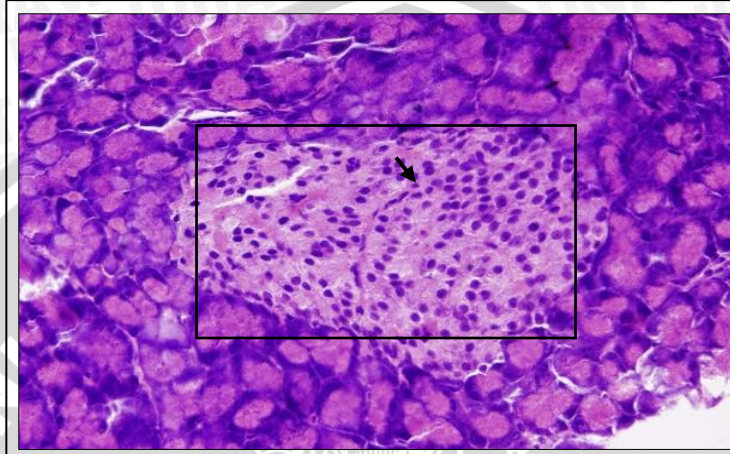
Hasil metabolisme lemak akan melakukan aktivitas respon inflamasi dengan melakukan aktivasi pada signaling inflamatori kinase di dalam sel bersamaan dengan itu hasil oksidasi dari asam lemak yaitu ROS (*reactive oxygen species*) di dalam mitokondria juga akan menginduksi JNK dan juga IKK. Dimana aktivitas dari inflamatori kinase akan memicu rekrutmen dari molekul adhesi dan sitokin inflamatori hingga terbentuk plak aterosklerosis (Nakamura *et al.*, 2010).

## 5.2 Pengaruh perlakuan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) terhadap gambaran histopatologi pulau Langerhans pankreas

Pewarnaan Hematoxylin Eosin pada organ pankreas digunakan untuk mengetahui tingkat kerusakan pada pulau Langerhans sebagai penanda adanya gangguan pada *uptake* insulin ke dalam sel (resistensi insulin) oleh perlakuan pemberian diet aterogenik. Keadaan resistensi insulin mengakibatkan kerusakan gambaran histopatologi baik secara kuantitatif (penurunan ukuran sel, dan peningkatan ukuran sel) maupun secara kualitatif (degenerasi sel, perubahan struktural dari sel maupun peningkatan jumlah jaringan ikat). Pulau Langerhans merupakan kumpulan sel endokrin yang tersebar di kelenjar eksokrin pankreas. Pulau Langerhans terdiri dari beberapa sel penghasil hormon endokrin diantaranya sel  $\beta$ , sel  $\alpha$ , sel  $\sigma$  dan sel PP (polipeptida pankreas). Pada topografi tikus dewasa sebaran sel-sel  $\beta$  pada pulau Langerhans berada di inti, sedangkan sel-sel lainnya seperti sel  $\alpha$ , sel  $\sigma$ , dan sel PP tersebar di bagian perifer membentuk mantel (Kuehnel, 2003). Kerusakan pada struktur dan morfologi pulau Langerhans disebabkan oleh perubahan metabolik sistemik karena ketidakpekaan insulin dan hilangnya kontrol glukosa. Peningkatan pulau (hipertrofi) dan menurun (atrofi) dalam ukuran, dirangsang oleh adanya hipersekresi oleh naiknya kebutuhan akan insulin, yang disebabkan resistensi insulin (David *et al.*, 2008).

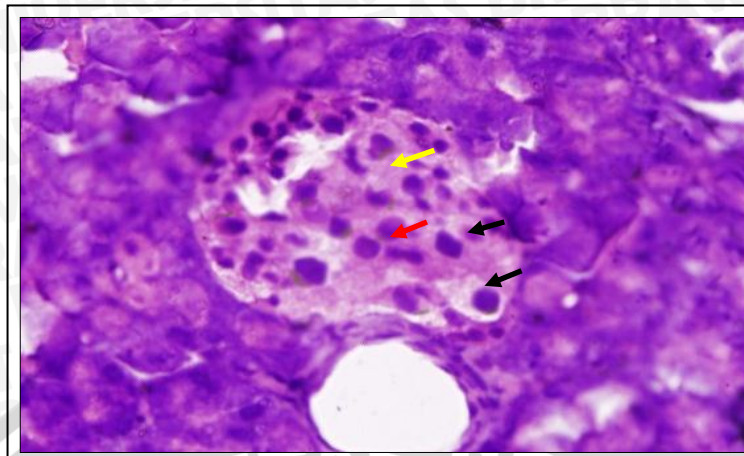
Kerusakan yang terdapat pada pulau Langerhans akibat resistensi insulin disebabkan adanya gangguan tingkat sel akibat manifestasi dari sitokin pro inflamatori yang diproduksi oleh sel dalam keadaan lipid mengalami peningkatan di dalam darah hal ini, diantaranya dihasilkan dari manifestasi sitokin, oksidatif

stres, atau stress pada retikulum endoplasma yang menyebabkan perubahan yang terjadi dalam ekspresi gen dan kelangsungan hidup sel (Norlin *et al.*, 2005; Donath *and* Halban, 2004).



**Gambar 5.3** Gambaran histologi pulau Langerhans pankreas tikus kelompok K1 (kontrol negatif) dengan metode pewarnaan H&E (Hematoxylin Eosin) perbesaran 400x ; (daerah dalam kotak) sel terlihat homogen, (panah hitam) gambaran sel terlihat normal.

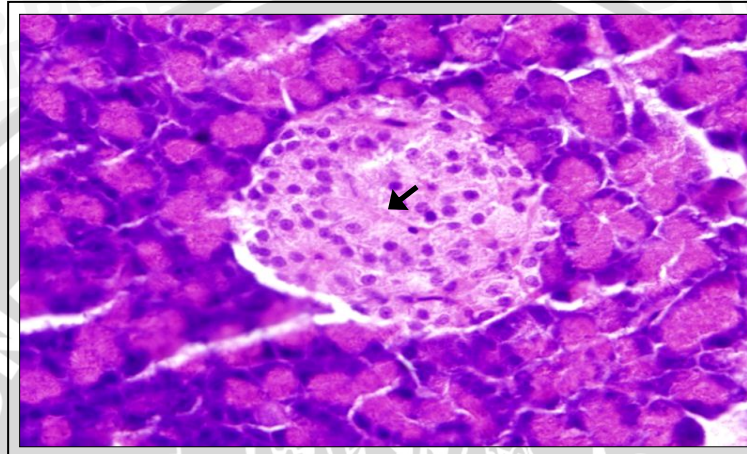
(Gambar 5.3) gambaran histopatologi pulau Langerhans tikus pada kelompok K1(-) kontrol negatif tanpa pemberian diet aterogenik, terlihat gambaran morfologi dan struktur normal pulau Langerhans, sel terdistribusi homogen di seluruh bagian pulau Langerhans. Tidak ada kerusakan pada sel maupun pada struktur dari pulau Langerhans, struktur dan ukuran terlihat normal tidak terdapat adanya hipertropi pada sel maupun adanya degenerasi dari sel.



**Gambar 5.4** Gambaran histopatologi pulau Langerhans pankreas tikus kelompok K2 (kontrol positif) dengan metode pewarnaan H&E (Hematoxylin Eosin) perbesaran 400x; (panah kuning) peningkatan jumlah jaringan ikat, (panah hitam) vakuolasi sitoplasma, (panah merah) hipertropi sel.

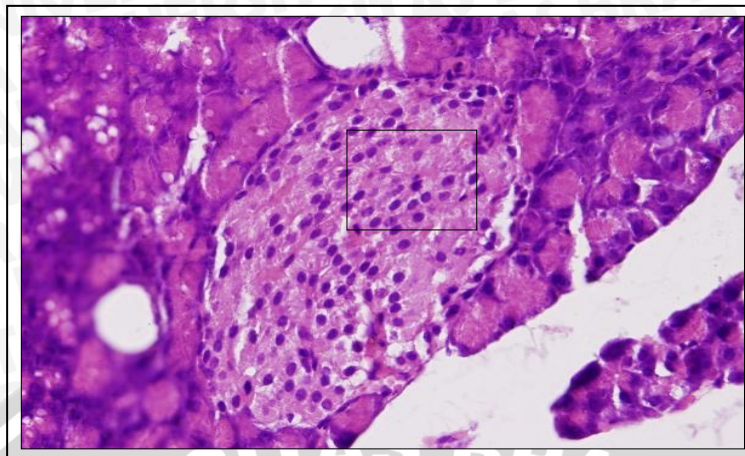
(Gambar 5.4) Merupakan gambaran histologi pulau Langerhans pada tikus kelompok kontrol positif menunjukkan derajat tinggi kerusakan dari pulau Langerhans dengan penampakan degenerasi sel berupa vakuolasi sitoplasma (panah hitam), pada bagian tengah dari pulau Langerhans terlihat berkurangnya jumlah *cluster* sel  $\beta$  dan terjadinya peningkatan jumlah jaringan ikat, terlihat pada (panah kuning). Hal ini menyebabkan struktur dan bentuk dari pulau langerhans terlihat irregular dan sel-sel Langerhans tidak terdistribusi secara homogen. Selain itu terlihat penampakan atropi yaitu penurunan ukuran dari pulau Langerhans dibandingkan dengan gambaran pulau Langerhans pada K1(-) dan juga sel-sel terlihat mengalami peningkatan ukuran (hipertropi) (panah merah). Diduga vakuolasi dari sitoplasma disebabkan oleh tahapan awal dari apoptosis akibat meningkatnya produksi dari *stress oxidative* yang diproduksi oleh tingginya aktivitas dari retikulum endoplasma pada sel  $\beta$  sebagai penanda adanya resistensi

insulin. Sedangkan peningkatan jumlah jaringan ikat diduga disebabkan oleh aktivasi dari IL-1 $\beta$  yang bersifat mitogen pada aktivitas fibroblast. Keadaan ini sejalan dengan tingginya kadar sitokin inflamatori yang di produksi saat lipid terdeposit tinggi dalam tubuh (Tedgui *and* Mallat, 2006).



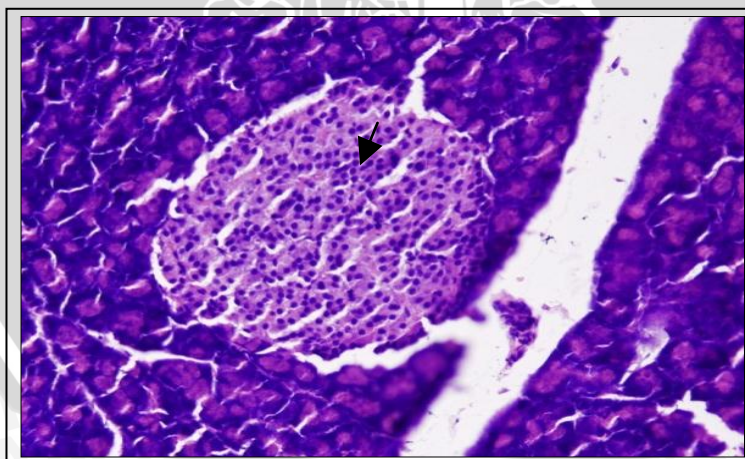
**Gambar 5.5** Gambaran histopatologi pulau Langerhans pankreas tikus kelompok K3 (perlakuan *Moringa oleifera Lam.* 0,034 ml) dengan metode pewarnaan H&E (hematoxylin eosin) perbesaran 400x.

(Gambar 5.5) kelompok K3 yaitu kelompok pemberian diet aterogenik ditambahkan dengan pemberian ekstrak *Moringa oleifera Lam.* dosis 0,034 ml. Derajat kerusakan terlihat berkurang dibandingkan dengan kelompok kontrol positif, tidak adanya vakuolasi pada sitoplasma, sel-sel tidak ditemukan mengalami perubahan ukuran, distribusi sel terlihat lebih homogen dibandingkan dengan kelompok kontrol positif tetapi jumlah *cluster* dari sel  $\beta$  pada bagian tengah tetap mengalami penurunan jumlah (panah hitam) tetapi tidak sebanyak pada kelompok kontrol positif.



**Gambar 5.6** Gambaran histologi pulau Langerhans pankreas tikus kelompok K4 (perlakuan *Moringa oleifera* Lam. 0,06 ml) dengan metode pewarnaan H&E (hematoxylin eosin) perbesaran 400x; (daerah dalam kotak) sel-sel tidak tersebar homogen.

(Gambar 5.6) Tingkat kerusakan gambaran histopatologi yang ditunjukkan sangat rendah, tidak adanya degenerasi sel, dan juga penurunan jumlah jaringan ikat namun distribusi sel-sel endokrin di dalam pulau Langerhans tidak tersebar secara homogen (daerah dalam kotak).



**Gambar 5.7** Gambaran histopatologi pulau Langerhans pankreas tikus kelompok K5 (perlakuan *Moringa oleifera* Lam. 0,115 ml) dengan metode pewarnaan H&E (hematoxylin eosin) perbesaran 400x.

(Gambar 5.7) Tidak terdapat degenerasi sel. Sel-sel endokrin terdistribusi homogen di seluruh pulau Langerhans, terjadi penurunan jumlah jaringan ikat dan struktur dari pulau Langerhans terlihat normal (panah hitam).

Hasil gambaran histopatologi pankreas menunjukkan terdapat perbedaan derajat kerusakan gambaran histopatologi antara kelompok kontrol negatif, (Gambar 5.3) kelompok kontrol positif (Gambar 5.4) dan kelompok perlakuan (Gambar 5.5, Gambar 5.6 dan Gambar 5.7). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian dari Rudolf *et al.* (2008) yang menunjukkan tingkatan kerusakan struktur dan morfologi pada pulau Langerhans yang ditimbulkan oleh adanya resistensi insulin, akibat tingginya kadar lipid dalam darah. Diduga berkurangnya derajat kerusakan gambaran histopatologi dikarenakan oleh kemampuan flavonoid sebagai substansi yang dapat menurunkan kadar sitokin proinflamasi. Hal ini didukung dengan pernyataan Kim *et al.* (2007) Flavonoid mempunyai kemampuan melakukan proteksi terhadap kerusakan sel  $\beta$  Langerhans, dengan menurunkan kadar IL-I, IFN-*gamma* dan juga *stress oxidative* dalam tubuh.

Gambaran histopatologi pulau Langerhans pada kelompok dengan pemberian ekstrak *Moringa oleifera Lam.* memiliki derajat kerusakan lebih rendah dibandingkan dengan kelompok perlakuan pemberian diet aterogenik tanpa pemberian ekstrak *Moringa oleifera Lam.* Diduga aktivitas dari flavonoid yang terkandung di dalam ekstrak *Moringa oleifera Lam.* mampu menurunkan produksi dari sitokin inflamatori sehingga dapat mengurangi aktivitas intraseluler inflamatori yaitu proliferasi fibroblast maupun rekrutmen dari sel-sel



immunologis, dampaknya tidak terjadi hambatan pada IRS-1 dan kerusakan gambaran histologi pada pulau Langerhans berkurang.

Kerusakan yang terjadi dalam pulau Langerhans bermula dari peningkatan kadar sitokin inflamatori yang meningkat seiring dengan peningkatan akumulasi lipid dalam darah, aktivitas sitokin inflamatori akan menginduksi terjadinya resistensi insulin melalui peningkatan SOCS3 yang meningkat seiring dengan peningkatan kadar sitokin inflamatori. Sesuai dengan pernyataan Russell (2004) Aktivitas dari SOCS3 akan menimbulkan efek berkebalikan (*reversed effect*) terhadap fosforilasi dari IRS-1 yang berperan dalam memfasilitasi GLUT-4 untuk melakukan absorpsi insulin kedalam sel muskulus.

Adanya kerusakan pada gambaran histologi dari pulau Langerhans berkaitan dengan menurunnya kemampuan GLUT-4 melakukan *uptaking* insulin ke dalam sel muskulus sehingga kadar insulin di luar sel meningkat hingga memicu *signal glucose mediated insulin* melakukan *signalling* terhadap ER (*endoplasmic reticulum*) terus menerus untuk memproduksi insulin, ketika kadar stressor dalam ER terus meningkat akan menginisiasi fosforilasi dari *elf2 $\alpha$*  oleh PERK yang mereduksi translasi dari protein (Jager *et al.*, 2007). Hal ini yang diduga sebagai penyebab berkurangnya jumlah *cluster* dari sel-sel  $\beta$  yang terdapat di bagian tengah pulau Langerhans ditunjukkan pada kelompok K2(+) dan kelompok perlakuan K3 (Gambar 5.4 dan Gambar 5.6). Keadaan berkurangnya cluster dari sel-sel  $\beta$  akan menimbulkan atrofi pada ukuran pulau Langerhans pankreas.

Di lain sisi kadar *stress oxidative* yang meningkat saat meningkatnya aktivitas dari ER akan melakukan *signalling* terhadap sel untuk terjadinya ikatan ligand dengan *death receptor* pada sel hingga aktivasi kaspase-8 dan kaspase-3 untuk melakukan apoptosis (Kroemer *et al.*, 2007). Kondisi tahap awal kematian sel ditunjukkan pada gambaran kerusakan vakuolasi pada sitoplasma dari kelompok K2(+) dan juga kelompok perlakuan K3. Hal ini didukung dengan pernyataan Baba (2009) Ciri morfologi dari kematian sel secara terprogram atau apoptosis diantaranya terjadi perubahan bentuk dan ukuran sel, memiliki sitoplasma yang kompak, terbentuknya vakuola pada membran sitoplasma, dan kondensasi kromatin pada nukleus. Perubahan ukuran dari pulau Langerhans ditunjukkan pada gambaran kelompok K2 (+) dan juga pada kelompok K3 yaitu penurunan ukuran dari pulau Langerhans (atrofi) yang memperlihatkan adanya kerusakan tingkat sel yang terjadi akibat resistensi insulin. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan Thoresen *et al.* (2002) menunjukkan adanya atrofi pada pulau Langerhans pankreas dari anjing yang mengalami resistensi insulin. Perbedaan derajat kerusakan pada antar kelompok kontrol, dan kelompok perlakuan, keadaan ini diduga dikarenakan perbedaan kadar sitokin inflamatori dan perbedaan derajat dari *stress oxidative* pada ER antara ke 3 kelompok perlakuan. Flavonoid yang terkandung dalam *M.oleifera Lam.* akan melakukan hambatan pada aktivitas *stress oxidative* yang terbentuk saat lipid terdeposit terlalu tinggi di dalam darah. Sehingga produksi sitokin inflamatori mengalami penurunan dan mengurangi resiko dari resistensi insulin yang berdampak terhadap berkurangnya profil kerusakan dari pulau Langerhans. Hasil gambaran

histopatologi K3, K4, dan K5 menunjukkan berkurangnya derajat kerusakan dibandingkan dengan kelompok kontrol positif K1(+) hal ini sejalan dengan hasil pengukuran IL-1 $\beta$  yang mengalami penurunan kadar seiring dengan peningkatan



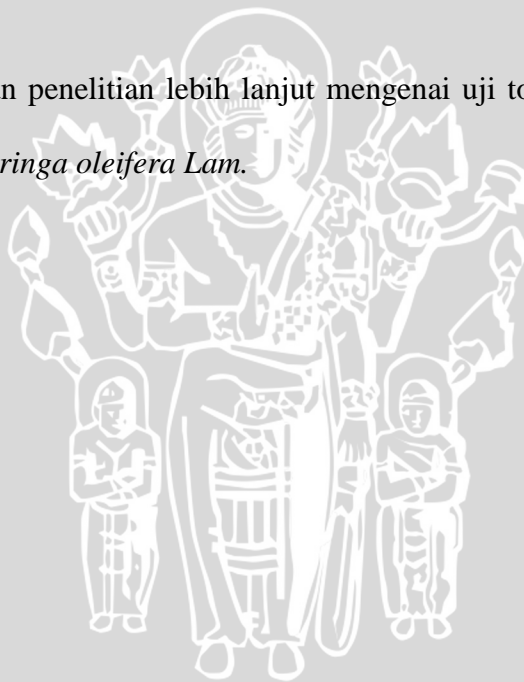
## BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1 Kesimpulan

1. Ekstrak air *Moringa oleifera Lam.* dapat menurunkan kadar IL-1 $\beta$  *Rattus norvegicus* strain Wistar yang diberikan diet aterogenik selama 8 minggu.
2. Ekstrak air *Moringa oleifera Lam.* dapat mengurangi derajat kerusakan gambaran histopatologi pulau Langerhans pankreas *Rattus norvegicus* strain Wistar yang diberikan diet aterogenik selama 8 minggu.

### 6.2 Saran

Dapat dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai uji toksisitas akut dan kronik dari ekstrak *Moringa oleifera Lam.*



## DAFTAR PUSTAKA

- Ajuwon, K.M., Michael E. Spurlock. 2004. Adiponectin Inhibits LPS-Induced NF $\kappa$ B Activation and IL-6 Production and Increase PPAR $\gamma$ 2 Expression in Adipocytes. *Am J Physiol Regul Intergr Comp Physiol.* 1-14.
- Andrea P., J. Andrew, W. Zena. 2007. Matrix Metalloproteinases And The Regulation Of Tissue Remodelling. *Mol Cell Biol.* 8(3): 221–233.
- Anonim. 2002. National Cholesterol Education Program National Heart, Lung, and Blood Institute National Institutes of Health NIH Publication American Academy. 02: 5215.
- Anonim. 2005. Official methods of Analysis of AOAC International. 2 vols.16 edition. Arlington VA. USA. Association of Analytical Community.
- Anonim. 2003. Obesity and Overweight. Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health. Geneva. World Health Organization. [http://www.who/obesity/overweight\\_obesity.pdf](http://www.who/obesity/overweight_obesity.pdf)
- Autieri M. V. 2012. Pro- and Anti-Inflammatory Cytokine Networks in Atherosclerosis. *Vascular medicine.*12:1-17.
- Baba A. I. 2009. Apoptosis And Necrosis. *Lucrări științifice medicină veterinară* vol. Xlii 2:347-359.
- Bacha J. W. 2000. Colour Atlas of Veterinary Histology 2<sup>nd</sup> edition. William and Wilkins. USA. 155-156.
- Bodary, Eitzmen, F. Peter ., T. Daniel. 2009. “Animal models of thrombosis,” Current Opinion in Hematology. *Hematology and Thrombosis.* 16:342–346.
- Calzada C., L. Coulon, D. Halimi, E. Le Coquil, Valérie P., P. Moulin, G. Ponsin, E. Véricel, M. Lagarde. 2007. In Vitro Glycoxidized Low-Density Lipoproteins and Low-Density Lipoproteins Isolated from Type 2 Diabetic Patients Activate Platelets via p38 Mitogen-Activated Protein Kinase. *Clinical Endocrinology & Metabolism* 92 :1961-1964
- Ching-Chow C., C. Man-Ping, H. Wei-Chien, L.Yi-Chu, C. Ya-Jen.2004. Flavonoids Inhibit Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -Induced Up- Regulation of Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) in Respiratory Epithelial

Cells through Activator Protein-1 and Nuclear Factor-kB: Structure-Activity Relationships. *Mol Pharmacol* 66:683–693.

Chiang, J. Y. 2009. "Bile Acids: Regulation Of Synthesis". *Journal of Lipid Research*. 50: 1955–66.

Chaoauche, T., F. Bekkara, F. Haddouchi, Z. Boucherit. 2012. Antibacterial Activity of Different Extract of *Echium pycnanthum* pommel. *Journal of Chemical and pharmaceutical Research*. 4:216-220

Dermengiu, D., G. C. Curca, N. Sarbu, S. Hostiuc, M. Ceausu. 2010. Sudden cardiac death in non-atherosclerotic and non-inflammatory intimal cellular proliferations. *A case report. Rom J Leg Med*. 18: 183 – 188

Donath M. Y., P. A. Halban. 2004. Decreased  $\beta$ -cell mass in diabetes: significance, Mechanisms and therapeutic implications. *Diabetologia* 47:581–589.

Dongming S., G. M. Coudriet, H. K. Dae , L. Yi, G. Perdomo, S. Qu, S. Slusher, H. M. Tse, J. Piganelli, N. Giannoukakis, Jian Z., H. H. Dong. 2008. FoxO1 Links Insulin Resistance to Proinflammatory Cytokine IL-1<sub>α</sub> Production in Macrophages. *Diabetes journal*. 58:2624-2633

Emanuelli B., M. Glondu, C. Filloux, P. Peraldi, E. Van Obberghen. 2004. The potential role of SOCS-3 in the interleukin-1 $\beta$ -induced. desensitization of insulin signaling in pancreatic beta-cells. *Diabetes journal*. 3:S97-S103

Emanuela F., M. Grazia, D. RobertisMarco, L. Paola, F. Giorgio, B. Marco. 2011. Inflammation as a Link between Obesity and Metabolic Syndrome. *Nutrition and Metabolism*. 2012:1-7.

Girn, H.R.S., N.M. Orsib and S. H. Vanniasinkam. 2007. An overview of cytokine interactions in atherosclerosis and implications for peripheral arterial disease. *Vascular medicine*. 12: 299–309.

German, A. J. 2005. The Growing Problem of Obesity in Dogs and Cats. *American Society for Nutrition*. 11:1940S-1947S.

Gerritsen, M. E. , W. W. Carley, G. E. Ranges, C. P. Shen, S. A. Phan, G. F. Ligon, C. A. Perry. 1995. Flavonoids inhibit cytokine-induced endothelial cell adhesion protein gene expression. *Am J Pathol*. 147: 278–292.

Goyal, B. R., B. B. Agrawal, Goyal, R. K., Mehta, A. A. 2007. Phytopharmacology of *Moringa oleifera* Lam. an Overview. *Natural Product Radiance*. 6:347-363.

- Guabiraba, Campanha-Rodrigues, Souza, Santiago, Lugnier , Alvarez-Leite, Lemos, Teixeira. 2010. The flavonoid dioclein reduces the production of pro-inflammatory mediators in vitro by inhibiting PDE4 activity and scavenging reactive oxygen species. *Eur J Pharmacol.* 3:85-92.
- Han S. N., L. S. Leka, A. H. Lichtenstein , L.M. Ausman, E.J. Schaefer, S.N. Meydani. 2002. Effect of hydrogenated and saturated, relative to polyunsaturated, fat on immune and inflammatory responses of adults with moderate hypercholesterolemia. *J Lipid Res.* 43:445-52.
- Havsteen, B. H. 2002. The Biochemistry and Medical significance of the Flavonoids. *Pharmacol Ther.* 96:67-202.
- Hsu, C.L., and G.W.Yen. 2007. Effects of Flavonoids and Phenolics Acids on The Inhibition of Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes. *J.Agric.Food Chem.* 55: 8404-8410.
- Holcik, M. and N. Sonenberg. 2005. Translational Control In Stress And Apoptosis. *Nature journal.* 6:318-127.
- Jain, P. G., S. D. Patil, G. N. Haswani, Manoj V. G., and S. J. Surana. 2010. Hypolipidemic activity of Moringa oleifera Lam., Moringaceae, on high fat diet induced hyperlipidemia in albino rats. *Journal of Pharmacognosy.* 20: 969-973.
- Jager, J., T. Gremeaux, M. Cormont, Y. L. Marchand-Brustel, J.F. Tanti. 2007. Interleukin-1 $\beta$  induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of irs-1 expression. *Endocrinology.* 148(1):241–251
- Jones, H. B., D. Nugent, R. Jenkins. 2010. Variation in characteristics of islets of Langerhans in insulin-resistant, diabetic and non-diabetic-rat strains. *Journal compilation.* 91:288–301.
- Junquiera. 2009. Junquiera's Basic Histology: text and atlas 12<sup>th</sup> edition. Mc Graw Hill companies. <http://www.accessmedicine.com>.
- Kamagate A, and H. H. Dong. 2008. FOXo1 Integrates Insulin Signaling To VLDL Production. *Cell Cycle* 7:3162–3170.
- Kaneto, H., Y. Nakatani, D. Kawamori, T. Miyatsuka, T. Matsuoka. 2004. Involvement of Oxidative Stress and the JNK Pathway in Glucose Toxicity. *Rev Diabet Stud.* 4:165-174.
- Kasolo, J. N., G. S. Bimenya, L. Ojok and J. W. Ogwal-okeng.2011. Phytochemicals and acute toxicity of Moringa oleifera roots in mice. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy.* 3:38-42.

- Kiernan, J. A. 1990. *Histological and histochemical Methods : Theory and Practice*. San Francisco & London : Pergamon Pr.
- Kim, E. K., K. B. Kwon, M.Y. Song, M. J. Han, J. H. Lee, Y. R. Lee, J. H. Lee, D. G. Ryu, B. H. Park, J. W. Park. 2007. Flavonoids Protect Against Cytokine-Induced Pancreatic [beta]-Cell Damage Through Suppression of Nuclear Factor [kappa] B Activation. *Journal neuroendocrine*. 35: 9.
- Kroemer G., Galluzzi L., Brenner C. 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol*. 1:99-163.
- Kuehnel, W. 2003. *Color Atlas of Cytology, Histology, and Microscopic Anatomy*. Thieme. USA. 268-270.
- Kusriningrum. 2008. *Rancangan percobaan*. Surabaya: Universitas Airlangga Press.
- Larsen C. M. 2007. Interleukin-1-Receptor Antagonist In Type 2 Diabetes Mellitus. *J Med*. 356: 1517– 1526.
- Lei, L., S. Masaharu, Y. Hidenori, I. Kojima. 2001. Promotion of  $\beta$ -cell regeneration by  $\beta$  cellululose in ninety percent-pancreatectomized rats. *Endocrinology*. 142:5379-85.
- Libby P., P. M. Ridker, G. K. Hansson. 2011. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 473 :317–325.
- Lina, Y., I. Patellongi, G. S. Lawrence, A. Wijaya, S. As'ad. 2011. Korelasi antara Adiponektin dengan Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) pada Pria Indonesia Obes non-Diabetes. Artikel Penelitian. Fakultas Kedokteran Universitas Hassanuddin, Makassar, Indonesia
- Lund, E. M., P. J. Armstrong, C. A. Kirk, J. S. Klausner. 2005. Prevalence and Risk Factors for Obesity in Adult Cats from Private US Veterinary Practices. *Intern J Appl Res Vet Med*. 3:88-96.
- Lund, E. M., P. J. Armstrong, C. A. Kirk, J. S. Klausner. 2006. Prevalence and Risk Factors for Obesity in Adult Dogs from Private US Veterinary Practices. *Intern J Appl Res Vet Med*. 4:177-186.
- Manthey J.A., K. Grohmann, N. Guthrie. 2001. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. *Curr Med Chem*. 8:135-53.



- Majumder M., C. Huang, M. D. Snider, A.A. Komar, J. Tanaka, R.J. Kaufman, D. Krokowski, M. Hatzoglou. 2012. A novel feedback loop regulates the response to endoplasmic reticulum stress via the cooperation of cytoplasmic splicing and mRNA translation. *Mol Cell Biol.* 5:992-1003
- Maiorana, A., C. Del Bianco, S. Cianfarani. 2007. Adipose Tissue: A Metabolic Regulator. Potential Implications for the Metabolic Outcome of Subjects Born Small for Gestational Age (SGA). *Diabet Stud.* 3: 134–146.
- Minami M., N. Kume, T. Shimaoka, H. Kataoka, K. Hayashida, Y. Akiyama, I. Nagata, K. Ando, M. Nobuyoshi, M. Hanyuu, M. Komeda, S. Yonehara, T. Kita . 2001. Expression of SR-PSOX, a novel cell-surface scavenger receptor for phosphatidylserine and oxidized LDL in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21: 1796–1800, 2001.
- Mutlu, G. M., D. Green, A. Bellmeyer. 2007. Ambient Particulate Matter Accelerates Coagulation Via An Il-6-Dependent Pathway. *J Clin Invest* 117:2952– 61.
- Murwani, S., M. Ali, K. Muliarta, 2006. Diet Aterogenik pada Tikus Putih (Rattus Novergicus strain Wistar) Sebagai Model Hewan Aterosklerosis. *Jurnal Kedokteran Universitas Brawijaya Vol. XXII No 1.* Malang
- Naghavi, M., P. Libby, E. Falk . 2003. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: part II. *Circulation.* 108:1772–1778.
- Nakamura T., Furuhashi M., P. Li, H. Cao, G. Tuncman, N. Sonenberg, Cz. Gorgun, Hotamisligil. 2010. Double-Stranded Rna-Dependent Protein Kinase Links Pathogen Sensing With Stress And Metabolic Homeostasis. *Cell.* 140:338-348
- Nathan, C. 2002. Points of control in inflammation. *Nature journal.* 420: 846–852
- Nieswandt, B. A., A. Moers, U. J. H. Sachs. 2005. Platelets in atherothrombosis: lessons from mouse models. *Thrombosis and Haemostasis.* 3: 1725–1736
- Noamesi, S., N. Amaglo, M. Adevu, M. G. Amengor, G. Dosu, P. Adjepong, S. Adam, and P. Attipoe. 2010. Growing And Processing Moringa Leaves. *Moringa Association of Ghana: Ghana*
- Norlin S., U. Ahlgren, H. Edlund. 2005. Nuclear factorKb activity in  $\beta$ cells is Required for glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes.* 54:125–132, 2005

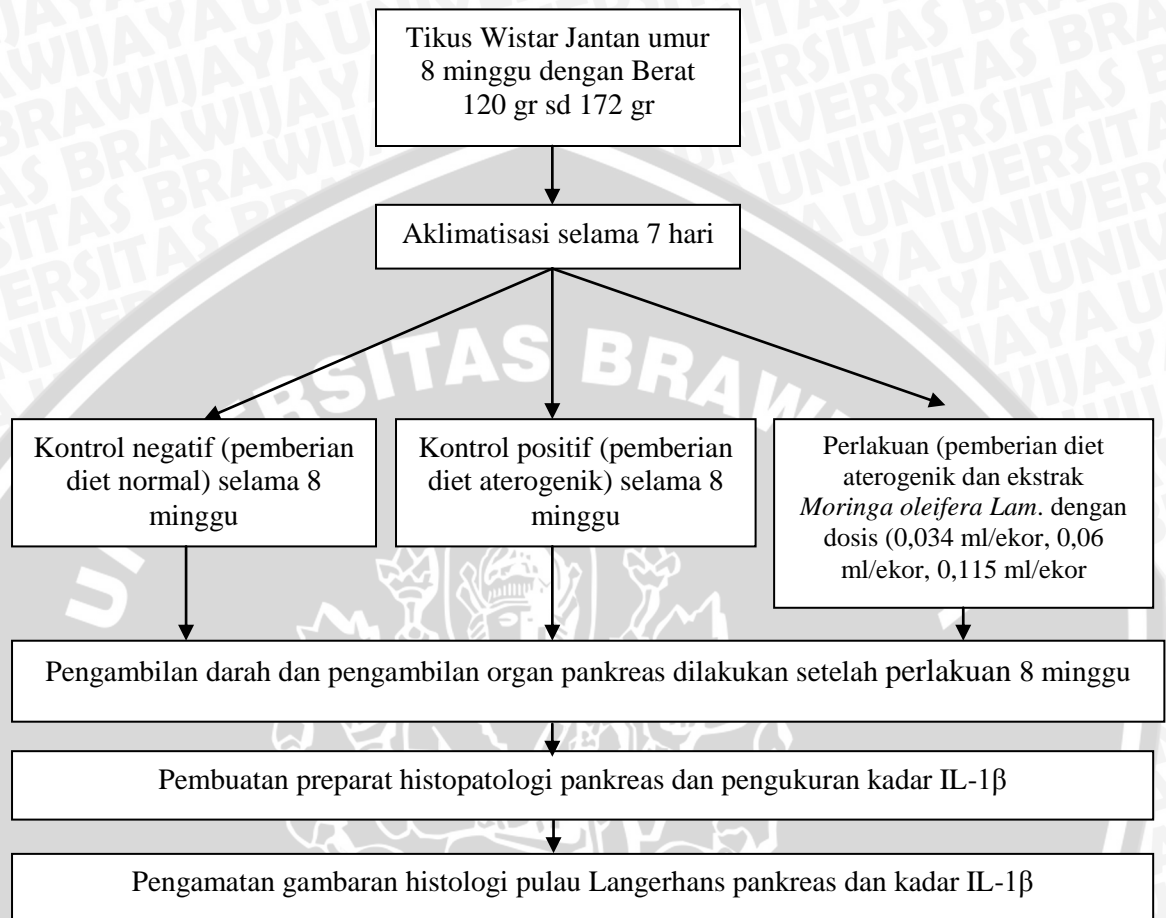
- Novelli E. L. B., Y. S. Diniz, C. M. Galhardi, G. M. X. Ebaid, H. G. Rodrigues, F. Mani, A. A. H. Fernandes. 2007. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Animal*. 41: 111.
- Orford, J. L. and A. P. Selwyn. 2005. Noncoronary Atherosclerosis Overview Atherosclerosis. <http://e-medicine.medscape.com/article/1950759/overview>. 19 februari 2013.
- Otero, M., R. J. J. Gomez, O. Gualillo, 2003. Synergistic induction of nitric oxide synthase type II: in vitro effect of leptin and interferon-gamma in human chondrocytes and ATDC5 chondrogenic cells. *Arthritis and Rheumatism* 48: 404–409.
- Ozcan U., Q. Cao, E. Yilmaz, A. H. Lee, N. N. Iwakoshi, E. Ozdelen, G. Tuncman, C. Gorgun, L.H. Glimcher, G. S. Hotamisligil. 2004. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*. 306:457–461.
- Pakurar, A. S., J. W. Bigbee. 2004. Digital Histology An Interactive CD Atlas with Review Text. John Wiley & Sons. New Jersey.1-3.
- Panagiotis G. X., M. Jörg Steiner. 2008. Lipid metabolism and hyperlipidemia in dogs. *The Veterinary Journal*. 183:12–21.
- Pian. 2006. Obesity. <http://fkuii.org/tiki-index.php?page=obesity4>. 21 februari 2013.
- Peluso, M. R. 2006. Flavonoids Attenuate Cardiovascular Disease, Inhibit Phosphodiesterase, and Modulate Lipid Homeostasis in Adipose Tissue and Liver. *Biol Med*. 231: 1287-1299.
- Pe'russe, L., J. Chagnon, Weisnagel. 2001. The Human Obesity Gene Map: the 2000 update. *Obes Res*. 9 :135-169.
- Potier, M. M. Karl, S. J. Elliot, G. E. Striker, L. J. Striker. 2003. Response to sex hormones differs in atherosclerosis-susceptible and -resistant mice. *Physiol Endocrinol Metab*. 285: E1237-E1245.
- Pusparini. 2006. Low Density Lipoprotein Padat Kecil Sebagai Faktor Risiko Aterosklerosis. Vol.25 No.1
- Russell A. P. 2004. Lipotoxicity: the obese and endurance-trained paradox. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 4:S66-71

- Rajanandh M. G., M. N. Satishkumar, E. K. Suresh B. 2012. Moringa oleifera Lam. A herbal Medicine For Hyperlipidemia: A Pre-Clinical Report : India. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 2012:S790-S795
- Rahmah, I. 2010. Pengaruh pemberian jus pare Momordica charantia terhadap jumlah foam cell di lapisan intima aorta tikus strain wistar yang diberi diet aterogenik. Fakultas Kedokteran. Universitas Brawijaya.
- Rodolfo G. M., Alberto D., Alberto O., Chavez-velazquez, Anthony C., T. E. J. C. Alvarenga, B. Raul, Z. Penghou, C. Zhi, D. Edward, H. Gene, A. Majluf, T. P. Ce, H. Glenn, A. D. Ralph, F. Franco. 2008. Effect of obesity and lipotoxicity on pancreatic islet of langerhans amyloidosis in the baboon, a new model of type 2 diabetes mellitus (t2dm). *American Diabetes*. Abstract number 1711-P.
- Santoso, E. K. 2009. Produksi IL-1 $\beta$  oleh makrofag yang dipapar Adhesin 61kDa Outer Membrane Protein (OMP) Chlamydia pneumonia secara in vitro. Fakultas Kedokteran. Universitas Brawijaya.
- Schenk, S., M. Saberi, M. O. Jerrold. 2008. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest*.9:2992–3002
- Schwartz R. S., E. J. Topol, P.W. Serruys, G. Sangiorgi, Holmes Jr. 1998. Artery Size, Neointima, And Remodeling: Time For Some Standards. *J Am Coll Cardiol.*; 32:2087–2094.
- Silverstein, R. L.(by invitation) Wei Li, Y. M. Park, S. Ohidar. 2010. Mechanisms of Cell Signaling by the Scavenger Receptor CD36: Implications in Atherosclerosis and Thrombosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc*.121: 206–220.
- Sinha, M., D. Kr Das, S. Datta, S. Ghosh, S. Dey. 2012. Epicatechin ameliorates ionising radiation-induced oxidative stress in mouse liver. *Free radic res*.46:842-9
- Sonnenberg G. E., G. R. Krakower, A. H. Kissebah. 2004. A Novel Pathway to the Manifestation Metabolic Syndrome. *Obesity Research*. 12 No. 2
- Spagnoli, L. G., E. Bonanno, G. Sangiorgi, A. Mauriello. 2007. Role of Inflammation in Atherosclerosis. *J Nucl Med*. 48:1800–1815
- Sun Q, A. Wang, X. Jun. 2005. Long-term air pollution exposure and acceleration of atherosclerosis and vascular inflammation in an animal model. *JAMA*.294:3003–10.

- Suwa T., J.C. Hogg, K. B. Quinlan, A. Ohgami, R. Vincent, S.F van Eeden. 2002. Particulate air pollution induces progression of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.*39:935– 42.
- Steinberg D. 2002. Atherogenesis In Perspective: Hypercholesterolemia and Inflammation As Partners In Crime. *Nature Med.* 8:1211–7.
- Tabas, I. 2005. Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency. *Arterioscler. Thromb.* 25: 2255–2264.
- Tedgui, A., and Z. Mallat. 2006. Cytokines in atherosclerosis ; pathogenic and regulatory pathway. *Physiol Rev.* 86 :515-581
- Tilg H., and A. R. Moschen. 2008. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. *Mol Med.* 3-4:222-31
- Thoresen, S.I. 2002. diabetes mellitus and bilateral cataracts in a kitten. *J feline med surg.*, 2: 115-22.
- Trayhurn P, I.S. Wood. 2004. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr.* 3:347-55
- Üçkaya, G., P. Delagrangé, A. Chavanieu, G. Grassy, M-F. Berthault, A. Ktorza, E. Cerassi, G. Leibowitz, N. Kaiser. 2005.Improvement of metabolic state in an animal model of nutrition-dependent type 2 diabetes following treatment with S23521, a new glucagon-like peptide 1 (GLP1) analogue. *J Endocrinol.* 184:505–13.
- Urs B., M. M. Ilondo, P. A. Holst, C.T. Christoffersen, M. Ouwens, S. Giorgetti, E. Van Obberghen, D. Naor, H. Tornqvist, De Meyts P. 2003. IRS-4 mediated mitogenic signalling by insulin and growth hormone in LB cells, a murine T-cell lymphoma devoid of IGF-I receptors. *Cell Signal.* 15:385-94.
- Vergnes L., J. Phan, M. Strauss, S. Tafuri, Reue K. 2003. Cholesterol And Cholate Components Of An Atherogenic Diet Induce Distinct Stages Of Hepatic Inflammatory Gene Expression. *Biol chem.* 278:42774-84
- Van Hove C. E., C. Van der Donckt, A.G. Herman, H. Bult, P. Franssen. 2009. Vasodilator Efficacy Of Nitric Oxide Depends On Mechanisms Of Intracellular Calcium Mobilization In Mouse Aortic Smooth Muscle Cells. *Br J Pharmacol.* 158:920–930.
- Vicenova, B., V. Vopalensky, L. Bursysek, M. Pospisek. 2008. Emerging role of interleukin-1 in cardiovascular diseases. *Physiol Res.* 58(4):481-98

- Vilahur G., T. Padro, L. Badimon. 2011. Atherosclerosis and Thrombosis: Insights from Large Animal Models. *Biomedicine and Biotechnology*. 11:2-11.
- Virmani R, F. D. Kolodgie, A. P. Burke, A. Farb, S.M. Schwartz. 2000. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 20:1262–1275.
- Versari, D., E. Daghini, A. Viridis, L. Ghiadoni, S. Taddei. 2009. Endothelium-Dependent Contractions And Endothelial Dysfunction In Human Hypertension. *Br J Pharmacol*. 4: 527–536.
- Von Der T., H. Jan, J. Kuiper, T. J. C. Van berkel, E. A. L. Biessen. 2003. Interleukins in Atherosclerosis: Molecular Pathways and Therapeutic Potential. *Pharmacol Rev* 55:133–166.
- Wang Y., H. Wang, V. Hegde, O. Dubuisson, Z. Gao, N. V. Dhurandhar, Ye J. 2013. Interplay of pro- and anti-inflammatory cytokines to determine lipid accretion in adipocytes. *Animal obesity*.10: 9-12.
- Wermuth, C. G. 2003. *The Practice of Medicinal Chemistry*. London: Acad. Press
- Wilcox, G. 2005. Insulin and Insulin Resistance. *Clin Biochem*. 2: 19–39.
- Whitman, S. C. 2004. A Practical Approach to Using Mice in Atherosclerosis Research. 25:81-93.
- Yang F., H. S. Oz, S. Barve, W. J. de Villiers, C. J. McClain, G. W. Varilek. 2001. The green tea polyphenol (-) -epigallocatechin-3-gallate blocks nuclear factor-kappa B activation by inhibiting I kappa B kinase activity in the intestinal epithelial cell line IEC-6. *Mol pharmacol*. 60:528-33.
- Ying, B., T. Yang, X. Song, X. Hu, H. Fan, X. Lu, L. Chen, D. Cheng, T. Wang, D. Liu. 2009. Quercetin inhibits IL-1 beta-induced ICAM-1 expression in pulmonary epithelial cell line A549 through the MAPK pathways. *Molecular Biology*. 36: 1825-1832.
- Zoico, E. 2006. In Vitro Aging Of 3t3-L1 Mouse Adipocytes Leads To Altered Metabolism And Response To Inflammation.. *Biogerontology*.11: 111-122.

### Lampiran 1. Skema Tahapan Penelitian



## Lampiran 2. Hasil pemeriksaan Kadar Interleukin-1 $\beta$

kelompok	Ulangan				Jumlah	Rata-rata
	I	II	III	IV		
K1(-)	62773	53682	59136	49136	224727	56181.750
K2(+)	160045	181864	198227	240045	780181	195045.250
K3	150045	203682	137318	130955	622000	155500.000
K4	112773	141864	151864	185500	592001	148000.250
K5	122773	136409	162773	126409	548364	137091.000



### Lampiran 3. Analisa statistika kadar Interleukin-1 $\beta$

#### 3.1 Uji Homogenitas

##### Test of Homogeneity of Variances

Interleukin			
Levene Statistic	df 1	df 2	Sig.
1.237	4	15	.337

Pada hasil pengujian menunjukkan nilai dari levene test sebesar 1,237 dengan nilai signifikansi sebesar 0,337 yang lebih besar dari alpha 0,05. oleh karena nila  $p > 0,05$ , maka  $H_0$  diterima dan dapat disimpulkan bahwa data yang digunakan mempunyai ragam yang homogen.

#### 3.2 Uji Normalitas

##### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Interleukin
N		20
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	138363.7
	Std. Deviation	52276.78
Most Extreme Differences	Absolute	.133
	Positive	.126
	Negative	-.133
Kolmogorov-Smirnov Z		.594
Asymp. Sig. (2-tailed)		.872

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Dari hasil pengujian normalitas pada Tabel 4.2 menunjukkan nilai dari *kolmogorof smirnof test* dengan nilai signifikansi ( $p$ ) sebesar 0,872. Oleh karena nila  $p > 0,05$ , maka  $H_0$  diterima dan dapat disimpulkan bahwa data yang digunakan mempunyai distribusi yang tersebar dengan normal. Dengan demikian



pengujian dengan menggunakan ANOVA dapat dilanjutkan karena kedua asumsi sudah terpenuhi.

### 3.3 Oneway ANOVA

**Descriptives**

Interleukin

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol Negatif	4	56181.75	6001.76398	3000.882	46631.6042	65731.8958	49136.00	62773.00
Kontrol Positif	4	195045.3	33832.25229	16916.13	141210.5869	248879.9131	160045.0	240045.0
Perlakuan III	4	155500.0	33087.28002	16543.64	102850.7540	208149.2460	130955.0	203682.0
Perlakuan IV	4	148000.3	29998.73620	14999.37	100265.5664	195734.9336	112773.0	185500.0
Perlakuan V	4	137091.0	18065.99472	9032.997	108343.9709	165838.0291	122773.0	162773.0
Total	20	138363.7	52276.77925	11689.44	113897.3642	162829.9358	49136.00	240045.0

**ANOVA**

Interleukin

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	41419226620.300	4	10354806655.08	14.785	.000
Within Groups	10505144712.250	15	700342980.817		
Total	51924371332.550	19			

Berdasarkan pada hasil analisis ANOVA pada Tabel 4.3 didapatkan bahwa nilai F hitung sebesar 14,785 dan  $p = 0,000$ . Karena mempunyai nilai  $p < 0,05$  dan F hitung  $> F$  tabel, maka dapat diputuskan untuk tolak  $H_0$ , yang berarti bahwa terdapat perbedaan perlakuan yang signifikan antara perlakuan.

### 3.4 Posthoc Tests

#### Multiple Comparisons

Dependent Variable: Interleukin

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol Negatif	Kontrol Positif	-138863.50*	18712.87	.000	-196647.4285	-81079.5715
	Perlakuan III	-99318.250*	18712.87	.001	-157102.1785	-41534.3215
	Perlakuan IV	-91818.500*	18712.87	.002	-149602.4285	-34034.5715
	Perlakuan V	-80909.250*	18712.87	.005	-138693.1785	-23125.3215
Kontrol Positif	Kontrol Negatif	138863.50*	18712.87	.000	81079.5715	196647.4285
	Perlakuan III	39545.250	18712.87	.265	-18238.6785	97329.1785
	Perlakuan IV	47045.000	18712.87	.139	-10738.9285	104828.9285
	Perlakuan V	57954.250*	18712.87	.049	170.3215	115738.1785
Perlakuan III	Kontrol Negatif	99318.250*	18712.87	.001	41534.3215	157102.1785
	Kontrol Positif	-39545.250	18712.87	.265	-97329.1785	18238.6785
	Perlakuan IV	7499.75000	18712.87	.994	-50284.1785	65283.6785
	Perlakuan V	18409.000	18712.87	.858	-39374.9285	76192.9285
Perlakuan IV	Kontrol Negatif	91818.500*	18712.87	.002	34034.5715	149602.4285
	Kontrol Positif	-47045.000	18712.87	.139	-104828.9285	10738.9285
	Perlakuan III	-7499.7500	18712.87	.994	-65283.6785	50284.1785
	Perlakuan V	10909.250	18712.87	.976	-46874.6785	68693.1785
Perlakuan V	Kontrol Negatif	80909.250*	18712.87	.005	23125.3215	138693.1785
	Kontrol Positif	-57954.250*	18712.87	.049	-115738.1785	-170.3215
	Perlakuan III	-18409.000	18712.87	.858	-76192.9285	39374.9285
	Perlakuan IV	-10909.250	18712.87	.976	-68693.1785	46874.6785

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

### 3.5 Homogenous Subsets

#### IL-1 $\beta$

Tukey HSD<sup>a</sup>

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
Kontrol Negatif	4	56181.75		
Perlakuan V	4		137091.0	
Perlakuan IV	4		148000.3	148000.3
Perlakuan III	4		155500.0	155500.0
Kontrol Positif	4			195045.3
Sig.		1.000	.858	.139

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

## Lampiran 4. Analisa statistika berat badan hewan coba selama pemeliharaan

### 4.1 Uji Homogenitas

#### Test of Homogeneity of Variances

Berat Badan

Levene Statistic	df 1	df 2	Sig.
.171	4	15	.950

Pada hasil pengujian menunjukkan nilai dari levene test sebesar 0,171 dengan nilai signifikansi sebesar 0,950 yang lebih besar dari alpha 0,05. oleh karena nilai  $p > 0,05$ , maka  $H_0$  diterima dan dapat disimpulkan bahwa data yang digunakan mempunyai ragam yang homogen.

### 4.2 Uji Normalitas

#### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Berat Badan
N		20
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	177.8500
	Std. Deviation	10.45429
Most Extreme Differences	Absolute	.088
	Positive	.082
	Negative	-.088
Kolmogorov-Smirnov Z		.393
Asymp. Sig. (2-tailed)		.998

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

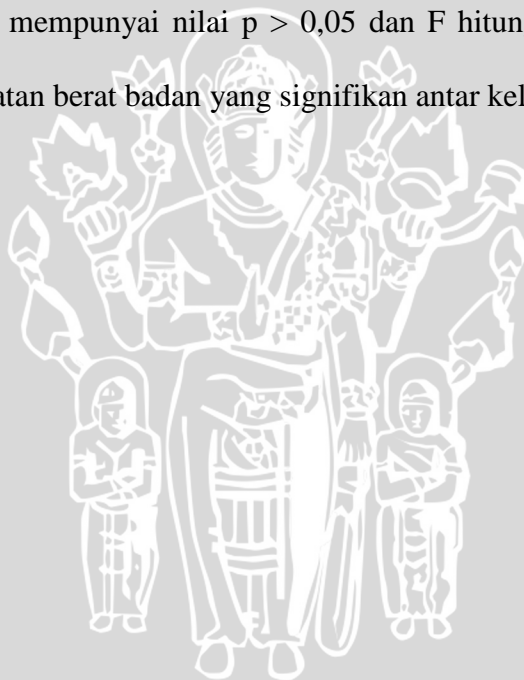
Dari hasil pengujian normalitas pada Tabel 4.2 menunjukkan nilai dari *kolmogorof smirnof test* dengan nilai signifikansi ( $p$ ) sebesar 0,998. Oleh karena nilai  $p > 0,05$ , maka  $H_0$  diterima dan dapat disimpulkan bahwa data yang digunakan mempunyai distribusi yang tersebar dengan normal.

### 4.3 Oneway ANOVA

#### ANOVA

Berat Badan	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	867.800	4	216.950	2.692	.071
Within Groups	1208.750	15	80.583		
Total	2076.550	19			

Berdasarkan pada hasil analisis ANOVA pada Tabel 4.3 didapatkan bahwa nilai F hitung sebesar 2,692 dan  $p = 0,000$  sedangkan F tabel pada  $df_1 = 4$ ;  $df_2 = 15$  sebesar 3,055. Karena mempunyai nilai  $p > 0,05$  dan  $F_{hitung} < F_{tabel}$ , maka tidak terdapat peningkatan berat badan yang signifikan antar kelompok perlakuan.



**Lampiran 5. Perhitungan dosis ekstrak *Moringa oleifera* Lam.**

**1. Hasil ekstraksi serbuk daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) sebanyak 100 gram**

Diketahui :

- BJ (berat jenis) ekstrak air daun kelor setelah diekstraksi = 1,09 gr/ml
- Hasil penimbangan hasil ekstraksi daun kelor = 48 gr

a. **Konversi dari gr ke ml**

$$S = \frac{W}{V}$$

Berat Jenis	=	Berat benda / volume benda
BJ	=	gr / ml
1,09	=	48 gr / X ml
X ml	=	48 / 1,09
Volume benda	=	44 ml

Maka 48 gram berat hasil ekstraksi sama dengan 44 ml volume ekstrak daun kelor

b. **Perhitungan berapa (gr) berat ekstrak dalam 1 ml volume :**

48 gr (berat)	=	44 ml (volume)
X gr	=	1 ml
44X	=	48
X	=	48/44
X	=	1,09 gram = 1090 mg

Maka dalam 1 ml (volume) ekstrak daun kelor terdapat 1,09 gram (berat) ekstrak daun kelor

**2. Cara perhitungan dosis setiap minggu berdasarkan berat badan**

**MINGGU 1**

a. **Kelompok Perlakuan III**, dosis ekstrak air daun kelor 150 mg/Kg BB  
 Berat ekstrak yang dibutuhkan dengan rata-rata berat badan 170,5 gram =

$$\begin{aligned} 150 \text{ mg} &= 1 \text{ kg} \\ X \text{ gr} &= 0,1705 \text{ kg} \\ X \text{ gr} &= 25,6 \text{ mg} \end{aligned}$$

Maka dosis yang dibutuhkan untuk 170,5 gram tikus adalah 25,6 mg  
 Diketahui 1 ml ekstrak = 1,09 gram = 1090 mg

$$\begin{aligned} 1 \text{ ml} &= 1090 \text{ mg} \\ X \text{ ml} &= 25,6 \text{ mg} \\ 1090 X &= 25,6 \\ X &= 25,6 / 1090 \\ X &= 0,023 \text{ ml} \end{aligned}$$

- Dosis yang dibutuhkan untuk setiap ekor tikus per hari pada kelompok perlakuan III sebanyak 25,6 mg atau 0,023 cc.
- Untuk mempermudah administrasi per oral dosis awal ditambahkan air sebanyak 1,97 cc, sehingga larutan ekstrak yang diberikan sebanyak ±2 ml/ hari.
- Dosis akan berubah setiap minggunya berdasarkan rata-rata perubahan berat badan pada setiap kelompok hewan coba.
- Perhitungan dosis berdasarkan Lampiran 11 (Tabel berat badan hewan coba).

**TABEL PEMBERIAN DOSIS *M.OLEIFERA LAM.* SETIAP MINGGU (ml)**

Kelompok	Minggu ke-								Mean
	1	2	3	4	5	6	7	8	
III (150 mg/kg BB)	0.023	0.026	0.03	0.033	0.032	0.039	0.040	0.046	0.034
IV (300 mg/kg BB)	0.043	0.044	0.057	0.054	0.061	0.066	0.074	0.084	0.060
V (600 mg/kg BB)	0.085	0.093	0.104	0.109	0.124	0.123	0.136	0.152	0.115



Lampiran 6. Tabel berat badan hewan coba selama pemeliharaan.

<b>TABEL PENGUKURAN BERAT BADAN TIKUS</b>												
Kelompok	Ulangan	Berat Badan Tikus Minggu Ke-									Kenaikan BB	MEAN
		Awal	2	3	4	5	6	7	8	9		
K1	1	129	151	167	189	185	281	235	240	205	76	81.75
	2	130	157	162	184	188	211	215	223	210	80	
	3	120	154	154	177	187	164	184	191	207	87	
	4	119	159	135	109	131	206	220	225	203	84	
K2	1	172	161	278	297	311	329	359	367	379	207	243.4
	2	163	155	160	179	187	225	235	250	356	193	
	3	152	165	158	197	205	200	254	325	377	225	
	4	163	174	202	216	225	238	243	335	369	206	
K3	1	135	156	180	215	239	262	283	299	343	208	197
	2	131	191	203	232	250	170	306	300	331	200	
	3	137	177	197	223	244	261	285	302	324	187	
	4	131	158	181	202	233	248	263	276	324	193	
Mean		<b>133.5</b>	<b>170.5</b>	<b>190.25</b>	<b>218</b>	<b>241.5</b>	<b>235.25</b>	<b>284.25</b>	<b>294.25</b>	<b>330.5</b>	<b>197</b>	
K4	1	151	151	122	136	122	167	205	250	304	153	161.5
	2	145	155	174	204	219	240	249	277	307	162	
	3	144	156	146	289	207	220	289	290	312	168	
	4	141	175	204	200	238	265	215	257	304	163	
Mean		<b>145.25</b>	<b>159.25</b>	<b>161.5</b>	<b>207.25</b>	<b>196.5</b>	<b>223</b>	<b>239.5</b>	<b>268.5</b>	<b>306.75</b>	<b>161.5</b>	
K5	1	140	158	178	202	204	235	238	233	288	148	133.75
	2	150	150	167	181	192	203	211	250	273	123	
	3	143	150	171	190	204	236	237	264	279	136	
	4	141	159	158	180	191	228	208	245	269	128	
Mean		<b>143.5</b>	<b>154.25</b>	<b>168.5</b>	<b>188.25</b>	<b>197.75</b>	<b>225.5</b>	<b>223.5</b>	<b>248</b>	<b>277.25</b>	<b>133.75</b>	

Lampiran 7. Tabel Perhitungan *Body Mass Index* (BMI)TABEL PENGUKURAN *BODY MASS INDEX* (BMI)

Kelompok	Ulangan	<i>Body weight</i>		<i>(lenght)</i>		BMI (Bw/length <sup>2</sup> )	
		Awal	akhir	Awal	Akhir	Akhir	awal
K1	1	129	205	14.5	15.6	0.61	0.84
	2	130	210	14.8	15	0.59	0.93
	3	120	207	14	14.5	0.61	0.98
	4	119	203	14.7	15	0.55	0.90
K2	1	172	379	15	15.7	0.76	1.54
	2	163	356	14.5	15	0.78	1.58
	3	152	377	14.7	15	0.70	1.68
	4	163	369	14	15	0.83	1.64
K3	1	135	343	14.8	15	0.62	1.52
	2	131	331	15	15	0.58	1.47
	3	137	324	14	14.5	0.70	1.54
	4	131	324	14.5	15	0.62	1.44
K4	1	151	304	14	15	0.77	1.35
	2	145	307	15	15.5	0.64	1.28
	3	144	312	14.5	14.8	0.68	1.42
	4	141	304	14.5	15	0.67	1.35
K5	1	140	288	14.8	15	0.64	1.28
	2	150	273	14.6	15	0.70	1.21
	3	143	279	14.5	15	0.68	1.24
	4	141	269	15	15.4	0.63	1.13



**Lampiran 8. Tabel konsumsi diet aterogenik dan diet normal.**

Hari Ke-	K1				K2				K3			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1	24.35	31.24	13.00	14.13	20.46	13.69	19.00	23.00	20.00	17.00	8.00	15.00
2	17.60	19.90	19.00	18.00	35.00	27.20	26.00	20.00	15.20	33.20	20.90	16.50
3	21.60	29.70	25.70	20.20	10.70	13.60	8.40	14.60	24.30	11.24	32.30	28.80
4	19.60	24.46	18.01	19.76	10.43	8.92	9.95	30.16	18.79	21.98	20.78	19.43
5	24.73	25.17	15.83	19.41	18.20	17.67	13.36	19.94	19.79	18.86	18.80	15.90
6	27.46	28.24	20.49	22.03	18.57	15.75	21.70	29.80	16.88	13.55	17.75	7.52
7	21.00	25.40	15.24	16.46	30.85	16.50	23.24	18.13	15.24	17.49	31.78	13.89
8	33.04	25.10	19.90	23.23	19.58	25.30	28.80	26.20	17.68	17.86	9.85	8.10
9	40.00	26.10	18.80	17.10	20.75	15.50	21.03	40.00	23.57	17.16	20.98	15.23
10	29.50	31.42	21.50	40.00	23.20	14.80	29.55	23.30	25.20	16.82	22.98	20.44
11	27.66	29.45	19.88	18.87	27.66	33.57	21.29	22.46	18.22	14.68	25.89	20.79
12	22.66	25.45	21.35	25.66	19.09	33.29	24.79	23.77	22.55	17.55	22.66	18.99
13	25.86	27.75	13.60	13.50	31.71	22.19	26.33	27.02	21.80	20.70	28.92	17.70
14	33.92	33.99	24.25	20.82	24.42	21.45	25.13	40.00	25.91	19.92	22.74	16.60
15	31.58	39.38	37.57	16.48	19.95	34.91	35.60	32.10	24.98	12.10	20.95	11.78
16	24.69	40.00	38.35	(3.87)	37.40	25.77	32.55	31.88	20.58	17.82	28.08	19.95
17	27.59	40.00	38.46	21.85	30.65	27.78	32.20	28.03	22.66	25.39	26.63	21.46
18	26.80	30.10	29.54	37.76	34.90	31.91	29.80	24.60	17.20	21.40	21.24	19.15
19	40.00	37.22	35.13	23.77	36.23	27.46	32.45	34.51	24.63	32.37	35.76	26.34
20	20.95	34.50	37.34	35.72	32.64	40.00	35.44	21.80	21.07	17.95	19.86	13.06
21	25.02	25.40	34.02	40.00	31.33	31.32	38.55	28.34	26.63	30.49	34.81	18.88
22	35.04	22.57	30.17	28.13	38.44	28.23	31.35	26.84	25.12	21.65	24.33	30.02
23	25.50	21.67	33.60	40.00	40.00	36.33	26.06	35.10	23.62	28.30	20.49	16.87

24	26.09	25.91	30.49	40.00	32.55	29.88	23.32	29.16	21.57	22.15	33.19	22.67
25	31.12	33.28	31.62	25.62	38.88	36.11	31.02	31.53	23.22	23.54	22.65	37.23
26	23.05	24.40	35.22	30.20	33.66	28.88	33.33	32.77	24.26	23.60	25.85	38.35
27	33.32	37.77	31.90	24.22	29.70	33.07	33.90	24.50	28.30	31.97	26.20	36.02
28	36.49	34.41	27.10	29.38	38.55	33.68	30.70	34.70	17.05	12.70	26.80	37.46
29	32.59	26.83	34.76	18.68	36.35	37.02	27.67	37.51	22.69	17.12	28.18	32.33
30	34.74	34.32	31.86	24.60	34.24	33.02	31.75	29.67	21.85	21.34	30.15	19.89
31	27.58	28.47	34.27	22.47	28.66	37.13	27.02	36.71	21.14	20.94	28.95	27.02
32	29.90	27.48	28.64	26.84	40.00	33.04	29.46	25.02	26.23	15.44	26.08	31.13
33	26.58	27.64	32.44	27.20	30.46	29.50	31.77	27.10	23.17	23.18	28.82	36.04
34	28.32	26.96	24.22	38.91	35.35	32.79	27.02	29.35	17.60	19.60	19.83	34.70
35	31.91	30.22	27.91	35.03	31.48	37.33	23.33	38.68	26.71	26.42	30.22	26.96
36	23.91	33.67	20.33	24.45	33.46	31.89	26.83	31.23	26.09	40.00	18.25	32.38
37	21.98	21.10	32.13	38.11	37.22	37.58	26.40	40.00	19.88	40.00	32.06	34.44
38	24.40	24.10	32.99	31.75	30.24	29.24	22.02	33.40	23.33	20.13	1.13	28.10
39	30.09	36.49	24.48	35.06	36.13	33.04	29.27	29.72	27.63	20.27	26.68	26.93
40	16.06	23.97	34.41	36.24	30.91	35.75	37.24	29.05	24.46	18.50	29.14	26.96
41	23.46	25.22	21.10	37.44	35.70	35.80	24.68	32.89	24.10	25.10	38.91	40.00
42	23.70	27.11	36.10	40.00	40.00	35.20	34.33	35.50	23.42	16.64	26.50	30.40
43	31.48	26.40	35.22	35.30	40.00	34.24	38.02	32.30	24.50	22.70	31.70	35.30
44	20.57	25.50	31.44	38.21	34.83	40.00	33.30	24.65	32.13	22.65	38.80	29.70
45	23.77	35.73	31.91	40.00	29.67	36.84	33.91	30.42	20.44	22.35	25.50	33.02
46	18.87	26.76	33.69	37.56	33.15	32.70	31.68	32.10	24.50	31.55	29.14	33.35
47	38.11	24.55	34.10	34.42	27.67	34.37	29.24	27.79	28.18	40.00	31.94	27.70
48	29.33	26.34	34.33	32.10	29.97	36.51	25.13	40.00	21.41	23.76	17.76	33.39



49	24.40	32.26	40.00	30.04	40.00	32.10	37.11	26.50	20.25	21.60	34.40	37.19
50	22.24	20.72	36.50	29.17	31.89	35.38	38.35	33.02	22.29	26.63	25.75	40.00
51	30.46	28.88	36.20	27.11	29.67	37.35	34.11	32.10	30.33	20.58	20.51	32.40
52	22.74	34.91	40.00	40.00	34.58	34.75	32.02	35.24	27.88	40.00	17.27	28.92
53	28.43	20.30	22.53	40.00	40.00	33.38	36.24	19.22	26.50	28.60	28.35	37.87
54	40.00	31.92	40.00	19.49	26.59	40.00	40.00	34.66	22.31	22.42	25.43	34.79
55	40.00	24.23	31.53	24.78	32.11	32.02	38.46	21.74	19.59	29.11	31.15	30.98
56	18.04	40.00	32.02	14.02	37.83	35.13	30.39	30.89	40.00	40.00	22.56	40.00
57	29.24	40.00	37.13	32.96	23.44	32.56	40.00	40.00	32.20	31.31	32.43	37.74
58	28.22	34.02	40.00	40.00	29.94	38.66	38.02	33.04	35.05	30.13	24.67	37.87
59	40.00	40.00	40.00	31.03	40.00	38.55	35.33	35.24	32.36	34.13	25.44	40.00
60	38.91	38.24	34.33	40.00	40.00	37.35	36.46	37.02	33.63	30.68	27.24	40.00
<b>Mean</b>	<b>27.94</b>	<b>29.57</b>	<b>29.73</b>	<b>28.36</b>	<b>31.12</b>	<b>30.75</b>	<b>29.52</b>	<b>29.93</b>	<b>23.80</b>	<b>23.71</b>	<b>25.44</b>	<b>27.36</b>

Hari Ke-	K4				K5			
	1	2	3	4	1	2	3	4
1	24.00	8.00	15.00	15.00	11.00	15.00	13.00	15.00
2	25.00	26.00	23.70	20.10	23.00	21.70	20.80	16.80
3	31.70	28.74	25.43	25.52	25.44	24.22	29.22	17.23
4	21.31	18.30	15.63	23.98	25.88	22.09	20.39	16.39
5	38.67	18.87	9.46	14.06	21.80	24.49	13.53	11.63
6	37.30	13.88	20.27	6.60	16.30	19.92	15.50	37.02
7	18.66	8.34	19.49	21.84	25.08	21.07	20.25	19.24
8	31.55	15.00	5.20	14.70	17.30	22.00	23.80	21.10
9	11.83	16.12	19.82	20.79	35.50	21.02	19.70	10.03
10	40.00	30.54	15.40	17.70	30.97	33.60	21.30	22.10
11	21.32	28.02	29.66	24.56	22.12	19.67	15.44	18.45

12	24.61	24.13	31.65	21.74	23.54	20.66	20.33	31.35
13	8.63	5.30	13.31	18.45	26.44	34.46	20.70	19.24
14	22.55	17.17	17.58	17.14	26.60	18.10	21.98	28.13
15	27.02	18.50	19.67	13.10	30.61	16.74	17.26	33.46
16	14.50	21.56	28.26	19.61	25.24	13.58	22.09	16.84
17	27.02	18.17	17.13	18.83	36.64	27.07	22.78	18.25
18	18.67	12.88	23.30	24.70	19.50	12.90	16.80	33.44
19	29.13	20.81	15.17	29.82	30.46	24.17	17.30	21.04
20	21.91	18.59	19.75	14.94	18.39	16.96	5.76	15.95
21	22.02	21.74	27.09	32.10	26.40	17.48	26.67	31.06
22	34.04	34.62	19.35	14.53	14.88	23.88	35.33	18.50
23	16.37	25.94	27.76	16.01	22.30	16.39	36.44	32.78
24	17.76	14.87	22.27	25.90	34.37	24.95	36.11	24.75
25	13.91	18.68	16.91	25.94	21.01	20.80	35.11	19.46
26	16.10	20.50	20.60	20.96	20.90	36.02	30.43	16.83
27	17.40	29.13	23.66	19.54	20.88	19.93	29.77	17.40
28	25.06	30.48	16.56	20.09	18.90	5.73	25.33	31.14
29	18.50	28.12	29.75	28.44	28.41	15.87	29.43	17.75
30	37.91	23.02	29.75	28.44	34.09	13.70	25.24	26.67
31	27.02	36.02	13.78	20.68	6.75	30.31	21.04	27.11
32	22.07	29.70	4.40	29.60	23.40	4.40	31.47	30.33
33	36.02	25.80	29.20	23.70	33.60	25.40	32.47	34.57
34	37.02	30.24	36.68	40.00	30.44	25.20	28.24	22.55
35	37.11	23.13	34.24	32.89	34.33	24.37	24.13	29.02
36	37.02	32.56	26.24	40.00	36.91	26.11	28.32	32.00
37	36.11	30.23	31.30	38.14	31.46	28.20	34.24	26.80
38	34.02	29.02	28.22	37.22	29.33	28.22	38.11	27.11
39								



	35.35	26.62	31.18	32.35	31.44	22.06	35.33	38.91
40	21.78	22.82	27.20	35.13	16.02	27.35	32.46	35.13
41	27.80	27.70	34.24	37.35	28.92	19.97	35.02	23.97
42	34.35	24.90	40.00	29.80	27.89	38.35	36.13	29.24
43	32.44	23.70	27.39	29.13	26.24	40.00	19.50	34.91
44	29.11	24.75	29.90	31.02	22.13	37.06	20.66	35.02
45	37.11	19.13	36.30	23.50	28.22	34.02	36.33	16.20
46	40.00	32.02	33.50	23.02	31.57	35.66	37.33	25.14
47	15.36	35.22	37.18	31.49	22.35	32.33	35.22	34.55
48	26.85	24.58	25.92	16.93	25.68	33.55	34.33	17.80
49	40.00	19.16	36.60	40.00	19.35	34.91	25.33	24.75
50	35.72	24.21	40.00	16.90	28.59	31.46	16.86	29.44
51	37.40	34.24	9.85	31.13	20.13	40.00	16.40	32.02
52	20.65	37.11	24.88	21.91	36.46	19.24	12.55	19.48
53	36.22	32.02	31.12	12.20	25.06	31.10	18.15	16.34
54	21.22	29.02	21.19	23.89	19.10	28.17	16.11	19.86
55	35.85	24.96	23.69	19.12	24.24	24.93	18.99	37.23
56	40.00	14.83	36.34	12.23	21.06	28.88	15.78	11.26
57	30.55	33.02	34.61	34.57	16.43	31.91	27.03	27.54
58	27.39	36.02	31.07	25.45	35.44	29.44	34.24	26.13
59	24.02	29.13	37.22	26.20	31.24	35.33	37.02	32.02
60	40.00	31.02	34.06	30.87	28.13	35.44	31.55	38.77
Mean	<b>27.83</b>	<b>24.32</b>	<b>25.10</b>	<b>24.36</b>	<b>25.43</b>	<b>25.13</b>	<b>25.30</b>	<b>24.90</b>



## Lampiran 9. Dokumentasi penelitian

### 9.1 Pembuatan diet aterogenik



### 9.2 Pemberian ekstrak *Moringa oleifera* Lam. dengan sonde lambung



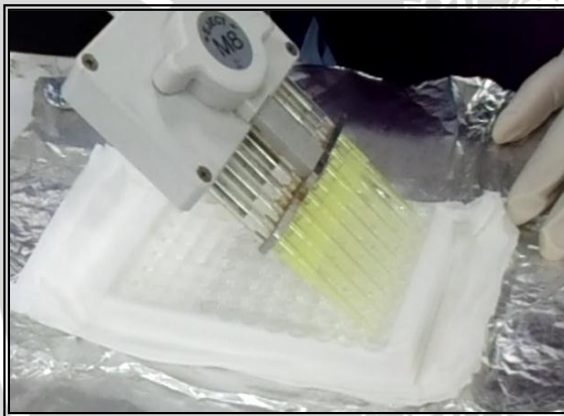
### 9.3 Prosedur Euthanasia *dislocatio os servical*



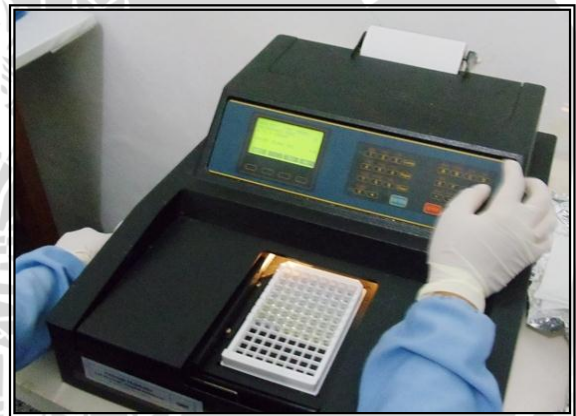
9.4 Pengambilan sampel darah (*intracardiac*)



9.5 Prosedur ELISA (pengukuran kadar IL-1 $\beta$ )



Washing dengan PBS-tween



Pembacaan OD dengan ELISA reader

9.6 Prosedur pembuatan preparat histopatologi HE(Hematoxylin eosin)



Slicing paraffin blok dengan *microtome*



Potongan jaringan pada *object glass*

### Lampiran 10. Surat Keterangan Laik Etik



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN  
 THE MINISTRY OF EDUCATION AND CULTURE  
 FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
 MEDICAL FACULTY BRAWIJAYA UNIVERSITY  
 KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN  
 THE ETHICAL COMMITTEE MEDICAL RESEARCH  
 Jalan Veteran Malang – 65145

Telp. (0341) 551611 Pes. 213.214; 569117, 567192 – Fax. (62) (0341) 564755

KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
 ("ETHICAL CLEARANCE")

No. 192A/EC / KEPK / 04 / 2013

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

JUDUL : EFEK PREVENTIF EKSTRAK AIR DAUN  
 KELOR (*Moringa oleifera*) TERHADAP  
 ATEROSKLEROSIS STADIUM AWAL PADA  
 TIKUS (*Rattus norvegicus*) strain wistar  
 YANG DIBERI DIET ATEROGENIK

PENELITI UTAMA : Dr.drh. SRI MURWANI 196301011989032001  
 ANGGOTA : drh. TIARA WIDYAPUTRI 84061114120404  
 ARI PURNEMASARI PUTU AMIJAYA 0911310033  
 LING SANDRA ARYASTYANI HAJAR AL KAHFI 0911313027  
 DWI AYU ROMADHONI 0911310009  
 WIDYA CIPTA NA 0911313036  
 GALUH CANDRA SETYA MP 0911310043

UNIT / LEMBAGA : PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN

TEMPAT PENELITIAN : KLINIK HEWAN PROGRAM KEDOKTERAN  
 HEWAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
 MALANG

DINYATAKAN LAIK ETIK

Malang, 26 APR 2013  
 Ketua



Prof. Dr. dr. Moch. Istiadjid ES, SpS, SpBS, M Hum



**SURAT PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Ling Sandra Aryastyani Hajar Al Kahfi

Nim : 0911313027

Program Studi : Program Studi Pendidikan Dokter Hewan

Program Kedokteran Hewan

Menyatakan bahwa penelitian saya yang berjudul “Pengaruh ekstrak *Moringa oleifera Lam.* terhadap kadar Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) dan gambaran histopatologi pulau Langerhans pankreas *Rattus norvegicus* strain Wistar dengan perlakuan diet aterogenik” merupakan bagian dari penelitian yang berjudul “Efek preventif ekstrak air daun kelor (*Moringa oleifera Lam.*) terhadap aterosklerosis stadium awal pada tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar yang diberi diet aterogenik”. Untuk itu kepemilikan dan hak publikasi menjadi hak milik dari peneliti utama DR. drh.Sri Murwani, MP.

Malang, September 2013

Yang membuat pernyataan,

Ling Sandra Aryastyani H.A.K  
0911313027