



**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN KELOR  
(*Moringa oleifera*) SEBAGAI ANTIOKSIDAN DALAM PROSES  
ANGIOGENESIS PADA EMBRIO AYAM YANG DIINDUKSI  
ETANOL**

**SKRIPSI**

Oleh

**Britta Fatika Sari  
NIM 152010101026**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2019**



**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN KELOR  
(*Moringa oleifera*) SEBAGAI ANTIOKSIDAN DALAM PROSES  
ANGIOGENESIS PADA EMBRIO AYAM YANG DIINDUKSI  
ETANOL**

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Pendidikan Dokter (S1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran

Oleh

**Britta Fatika Sari**  
**NIM 152010101026**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2019**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, taufiq, serta hidayah-Nya kepada saya, serta Nabi Muhammad SAW yang selalu menjadi teladan saya dalam segala tindakan;
2. Kedua orang tua saya, Bapak Hari Swasono dan Ibu Suntari, serta kedua kakak kandung saya, Mahdi Haris Hutama dan Rahmat Haris Awani, yang senantiasa mendoakan dan memberi dukungan, semangat, nasihat, dan motivasi untuk mengejar mimpi-mimpi saya;
3. Guru-guru saya dari masa kanak-kanak hingga perguruan tinggi yang telah memberikan ilmunya untuk mendidik saya menjadi pribadi yang lebih baik;
4. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember atas kesempatan untuk menimba ilmu dan menjadi bagian dari keluarga besar ini.

**MOTO**

Maka sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan.  
(Terjemahan QS. Al- Insyirah ayat 5)\*)



---

<sup>\*)</sup> Departemen Agama Republik Indonesia. 2006. *Al Qur'an dan Terjemahannya*. Bandung: Sygma Examedia Arkanleema.

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Britta Fatika Sari

NIM : 152010101026

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) Sebagai Antioksidan Dalam Proses Angiogenesis pada Embrio Ayam yang Diinduksi Etanol” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 22 Januari 2019

Yang menyatakan,

Britta Fatika Sari  
NIM 152010101026

**SKRIPSI**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN KELOR (*Moringa oleifera*)  
SEBAGAI ANTIOKSIDAN DALAM PROSES ANGIOGENESIS PADA  
EMBRIO AYAM YANG DIINDUKSI ETANOL**

Oleh

**Britta Fatika Sari**  
**152010101026**

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : dr. Suryono, Sp.JP.FIHA

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Rena Normasari, M.Biomed

**PENGESAHAN**

Skripsi yang berjudul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) Sebagai Antioksidan Dalam Proses Angiogenesis pada Embrio Ayam yang Diinduksi Etanol” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji

Ketua,

Anggota I,

dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si  
NIP.198409162008012003

dr. Dion Krismashogi D, M.Si  
NIP.198609162014041002

Anggota II

Anggota III,

dr. Suryono, Sp.JP.FIHA  
NIP.196910112000031001

dr. Rena Normasari, M.Biomed  
NIP.198305122008122002

Mengesahkan  
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember,

dr. Supangat, M.Kes, Sp.BA, Ph.D  
NIP 197304241999031002

## RINGKASAN

**Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) Sebagai Antioksidan Dalam Proses Angiogenesis pada Embrio Ayam yang Diinduksi Etanol;** Britta Fatika Sari, 152010101026; 47 halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Penyembuhan luka merupakan proses fisiologis penting bagi tubuh untuk mengembalikan fungsi normalnya akibat kerusakan jaringan. Di antara penyebab kerusakan jaringan adalah trauma, penyakit, defek atau kelainan, keganasan, dan zat kimia toksik seperti alkohol. Pada tahun 2010 WHO mencatat 3,3 juta jiwa kematian dan 60 jenis penyakit timbul akibat alkohol. Salah satu jenis alkohol, yaitu etanol menyebabkan kerusakan jaringan dengan memproduksi ROS. ROS dapat menyebabkan iskemi jaringan, sehingga tubuh akan melakukan upaya perbaikan jaringan salah satunya melalui proses pembentukan kapiler baru (angiogenesis). Angiogenesis dipilih sebagai parameter penelitian karena pada proses penyembuhan luka, jaringan memerlukan oksigen dan nutrisi agar dapat berproliferasi dengan baik sehingga dibutuhkan suatu proses angiogenesis yang dapat memfasilitasi hal tersebut. Kelor dikenal sebagai tanaman dengan aktivitas antioksidan tinggi. Kandungan flavonoid dan vitamin C pada daun kelor diketahui sebagai antioksidan yang mampu menangkal radikal bebas. Embrio ayam merupakan model coba yang baik untuk bidang toksikologi dan embriologi. Embrio ayam dipilih sebagai model coba karena murah dan masa eksperimen lebih singkat.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) sebagai antioksidan dalam proses angiogenesis pada embrio ayam yang diinduksi etanol. Jenis penelitian ini adalah penelitian *true experimental* dengan rancangan penelitian *post tes only control group design* yang dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Penelitian ini menggunakan 25 telur ayam fertil usia 1 hari

dari varietas ayam jawa super sebagai sampel penelitian. Pemilihan dan pengelompokan telur dilakukan dengan *simple random sampling*. Telur kemudian dibagi menjadi 5 kelompok yaitu K(-), K(+), P1, P2, dan P3. Telur ayam fertil usia 1 hari diinkubasi pada suhu 37°C dengan kelembapan 70-80%. Kelompok K(-) merupakan kelompok yang tidak diberi perlakuan apapun, kelompok K(+) diberikan etanol 10% dan aquades, sedangkan kelompok P1, P2, dan P3 diberikan etanol 10% dan ekstrak daun kelor dengan dosis masing-masing 0,5 µg/ml, 5 µg/ml, 50 µg/ml di *air sac* telur.

Hasil penelitian didapatkan rata-rata jumlah pembuluh darah baru kelompok K(-) sebesar 44,6, kelompok K(+) sebesar 13,8, kelompok P1 sebesar 22,2, kelompok P2 sebesar 28,4 dan kelompok P3 sebesar 34,3. Dari ketiga kelompok perlakuan tersebut, kelompok P3 dengan pemberian ekstrak daun kelor dosis 50 µg/ml menunjukkan hasil yang paling baik dibandingkan dengan kelompok lain. Hasil analisis data menunjukkan data terdistribusi normal dan homogen kemudian dilanjutkan dengan analisis *One Way ANOVA* yang menunjukkan hasil signifikan dengan  $p=0,000$  ( $p<0,05$ ). Hasil uji *Post Hoc LSD* menunjukkan terdapat perbedaan signifikan secara statistik antara kelompok K(-) dengan kelompok P1, P2, dan P3 sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) sebagai antioksidan dapat memperbaiki angiogenesis pada embrio ayam yang diinduksi etanol.

## PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga peneliti dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) Sebagai Antioksidan Dalam Proses Angiogenesis pada Embrio Ayam yang Diinduksi Etanol”. Skripsi ini diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan di Fakultas Kedokteran Universitas Jember (S1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. Drs. Moh. Hasan, M.Sc., Ph.D selaku Rektor Universitas Jember;
2. dr. Supangat, M.Kes, Sp.BA, Ph.D, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
3. dr. Suryono, Sp.JP.FIHA selaku Dosen Pembimbing Utama dan dr. Rena Normasari, M.Biomed selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, serta perhatiannya untuk membimbing penulisan skripsi ini sejak awal hingga akhir;
4. dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si selaku Dosen Penguji Utama dan dr. Dion Krismashogi D, M.Si selaku Dosen Penguji Anggota yang banyak memberikan kritik, saran, dan masukan yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
5. Mbak Nurul Istinaroh, Amd selaku Analis Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Jember dan Pak Budi selaku penanggung jawab UPT Pertanian dan Peternakan Politeknik Negeri Jember yang banyak membantu penulis dalam menyelesaikan penelitian ini;
6. Kedua orang tua saya, Bapak Hari Swasono dan Ibu Suntari yang selalu memberikan doa, kasih sayang, dukungan, semangat, dan motivasi untuk menyelesaikan penulisan skripsi ini;
7. Kedua kakak kandung saya, Mahdi Haris Utama dan Rahmat Haris Awani yang telah memberikan doa dan motivasi untuk menyelesaikan tugas akhir ini;

8. Rekan penelitian saya, Fais Dina Artika dan Nabela Karima Putri yang telah memberikan semangat dan motivasi selama penelitian;
9. Sahabat-sahabat saya sejak maba, Imelda Nafa Pawestri, Fais Dina Artika, Desi Dwi Cahyani, Umi Azizah, Wasilatus Sholehah, Puput Sagita Mey Sandra, dan Warda Ayu Nadira yang telah memberikan semangat dan memotivasi untuk segera menyelesaikan penulisan skripsi ini;
10. Teman-teman angkatan 2015 yang sedang bersama-sama berjuang untuk mendapatkan gelar sarjana kedokteran;
11. Semua pihak yang telah memberikan bantuan dan dukungan dalam penyusunan karya tulis ilmiah ini, yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu.

Penulis juga menerima kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Semoga karya tulis ini dapat memberikan manfaat bagi pembaca dan khususnya untuk perkembangan Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Jember, 22 Januari 2019

Penulis

**DAFTAR ISI**

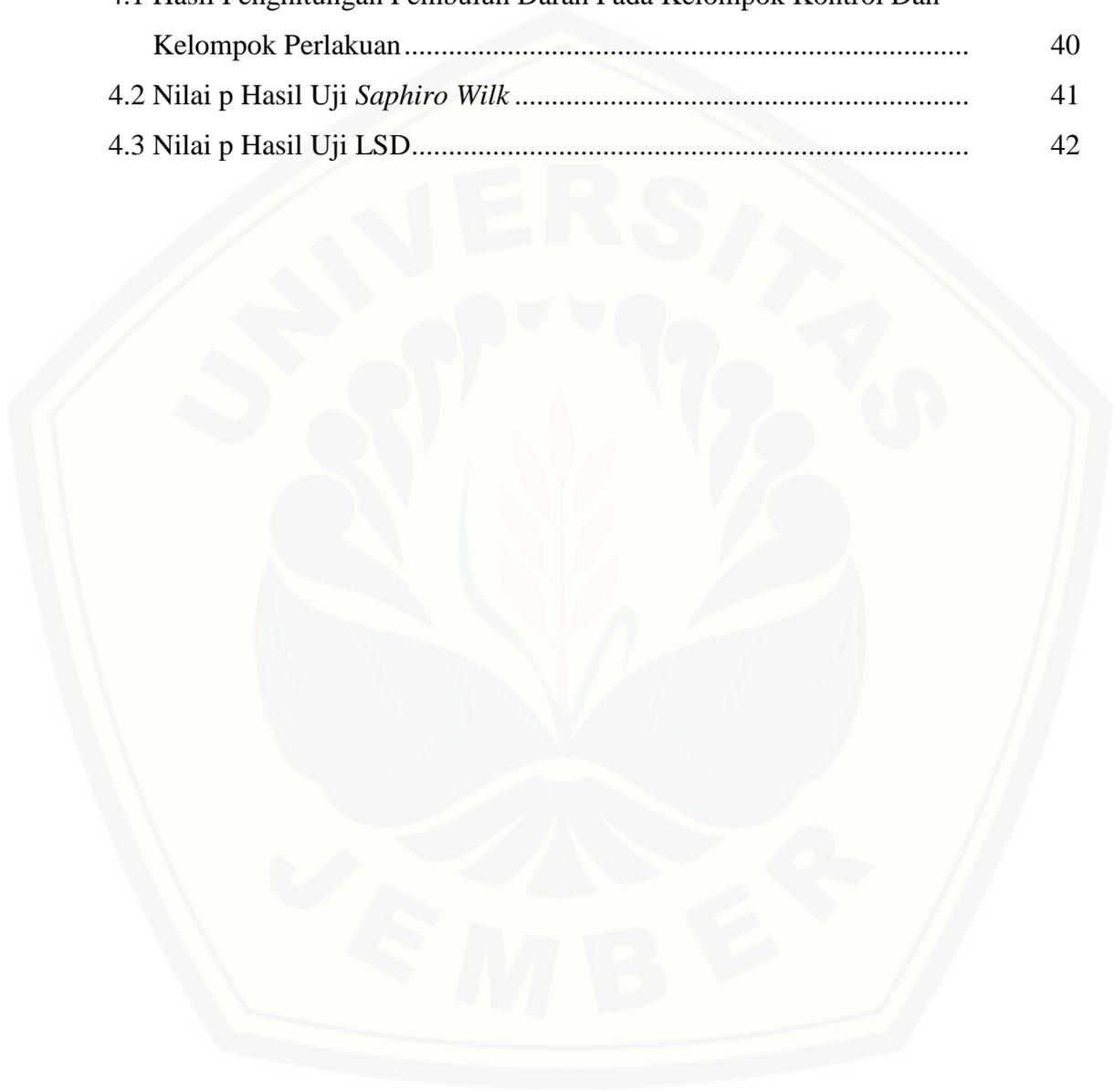
	Halaman
<b>HALAMAN SAMPUL</b> .....	i
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	ii
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	iii
<b>HALAMAN MOTO</b> .....	iv
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	v
<b>HALAMAN PEMBIMBING</b> .....	vi
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vii
<b>RINGKASAN</b> .....	viii
<b>PRAKATA</b> .....	x
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xv
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xvi
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xvii
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	3
<b>1.3 Tujuan Penelitian</b> .....	4
<b>1.4 Manfaat Penelitian</b> .....	4
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	5
<b>2.1 Etanol</b> .....	5
2.1.1 Definisi Etanol.....	5
2.1.2 Karakteristik Etanol.....	5
2.1.3 Metabolisme Etanol.....	5
2.1.4 Kegunaan Etanol .....	6

2.1.5 Bahaya Etanol Terhadap Kesehatan.....	7
2.1.6 Efek Induksi Etanol pada Embrio Ayam .....	8
<b>2.2 Radikal Bebas.....</b>	<b>9</b>
<b>2.3 Jejas Sel.....</b>	<b>11</b>
2.3.1 Etiologi Jejas Sel.....	12
2.3.2 Mekanisme Jejas Sel .....	14
<b>2.4 Angiogenesis .....</b>	<b>15</b>
<b>2.5 Tanaman Kelor .....</b>	<b>17</b>
2.5.1 Morfologi Tanaman Kelor .....	17
2.5.2 Taksonomi Tanaman Kelor.....	18
2.5.3 Kandungan Daun Kelor .....	19
<b>2.6 Ekstraksi.....</b>	<b>20</b>
<b>2.7 Membran Korio Alantois Telur Ayam Berembrio.....</b>	<b>21</b>
2.7.1 Perkembangan Embrio Ayam dari Hari ke Hari.....	23
<b>2.8 Kerangka Konseptual Penelitian.....</b>	<b>26</b>
<b>2.9 Hipotesis Penelitian.....</b>	<b>28</b>
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>29</b>
<b>3.1 Jenis Penelitian.....</b>	<b>29</b>
<b>3.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....</b>	<b>29</b>
<b>3.3 Populasi dan Sampel Penelitian.....</b>	<b>29</b>
3.3.1 Populasi.....	29
3.3.2 Sampel .....	29
<b>3.4 Rancangan Penelitian .....</b>	<b>30</b>
<b>3.5 Variabel Penelitian.....</b>	<b>31</b>
3.5.1 Variabel Bebas .....	31

3.5.2 Variabel Terikat .....	31
3.5.3 Variabel Terkendali .....	31
<b>3.6 Definisi Operasional</b> .....	32
<b>3.7 Alat dan Bahan Penelitian</b> .....	32
3.7.1 Alat Penelitian.....	32
3.7.2 Bahan Penelitian .....	33
<b>3.8 Prosedur Penelitian</b> .....	33
3.8.1 Uji Kelayakan Etik .....	33
3.8.2 Pembuatan Ekstrak Daun Kelor.....	33
3.8.3 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Daun Kelor.....	33
3.8.4 Tahap Perlakuan Terhadap Media Telur Ayam.....	34
3.8.5 Tahap Pengamatan .....	35
<b>3.9 Analisis Data</b> .....	35
<b>3.10 Alur Penelitian</b> .....	36
3.10.1 Skema Pembuatan Ekstrak Daun Kelor.....	36
3.10.2 Alur Penelitian .....	37
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	38
<b>4.1 Hasil Penelitian</b> .....	38
<b>4.2 Analisis Data</b> .....	41
<b>4.3 Pembahasan</b> .....	43
<b>BAB 5. PENUTUP</b> .....	47
<b>5.1 Kesimpulan</b> .....	47
<b>5.2 Saran</b> .....	47
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	48

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
3.1 Definisi Operasional .....	32
4.1 Hasil Penghitungan Pembuluh Darah Pada Kelompok Kontrol Dan Kelompok Perlakuan .....	40
4.2 Nilai p Hasil Uji <i>Saphiro Wilk</i> .....	41
4.3 Nilai p Hasil Uji LSD.....	42



**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
2.1 Metabolisme Etanol .....	6
2.2 Mekanisme Jejas Sel .....	15
2.3 Proses Angiogenesis .....	16
2.4 Daun Kelor ( <i>Moringa oleifera</i> ).....	18
2.5 Chorio Allantoic Membrane (CAM) .....	22
2.6 Skema Kerangka Konseptual Penelitian .....	26
3.1 Skema Rancangan Penelitian .....	30
3.2 Skema Pembuatan Ekstrak Daun Kelor .....	36
3.3 Skema Perlakuan Pada CAM Embrio Ayam .....	37
4.1 Angiogenesis Pada CAM Embrio Ayam Kelompok Kontrol .....	38
4.2 Angiogenesis Pada CAM Embrio Ayam Kelompok Perlakuan .....	39
4.3 Diagram Batang Rata-Rata Jumlah Pembuluh Darah Pada Kelompok Kontrol Dan Kelompok Perlakuan.....	41

**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
3.1 Pembuatan Ekstrak Daun Kelor .....	53
3.2 Perlakuan Telur Ayam Berembrio .....	54
3.3 Persetujuan Etik Penelitian .....	56
3.4 Rekomendasi Bebas Plagiasi .....	58
4.1 Hasil Uji Normalitas Data .....	59
4.2 Hasil Uji Homogenitas Data .....	59
4.3 Hasil Uji <i>One Way Anova</i> .....	59
4.4 Hasil Uji <i>Post Hoc LSD</i> .....	60

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Penyembuhan luka akibat kerusakan jaringan merupakan proses fisiologis penting bagi tubuh untuk mengembalikan fungsinya. Kerusakan jaringan menjadi akar timbulnya sebagian penyakit yang dapat disebabkan oleh trauma, penyakit, defek atau kelainan, keganasan, serta paparan zat kimia toksik, salah satunya alkohol (Widayati, 2012). Alkohol adalah zat psikoaktif yang sering disalahgunakan masyarakat meskipun terbukti menimbulkan dampak negatif bagi kesehatan. Secara global, WHO (*World Health Organization*) mencatat 3,3 juta jiwa kematian tiap tahun serta 60 jenis penyakit timbul akibat penggunaan alkohol (WHO, 2010). Dewasa ini, mengonsumsi alkohol menjadi faktor risiko terjadinya berbagai macam penyakit, diantaranya penyakit kardiovaskuler, penyakit saluran pencernaan, kanker, gangguan mental dan perilaku, gangguan imunologis, gangguan reproduksi, peningkatan risiko prematuritas serta berat badan lahir rendah (BBLR) (Anderson, 2012).

Etanol merupakan zat kimia yang menyebabkan kerusakan jaringan melalui mekanisme radikal bebas. Jika etanol masuk ke dalam tubuh dalam jumlah banyak serta dalam jangka waktu lama akan menyebabkan timbulnya metabolit sekunder yang dapat bertindak sebagai radikal bebas hingga menyebabkan kerusakan sel dan jaringan (Widayati, 2012). Oksidasi etanol dapat menyebabkan terbentuknya ROS yang menjadi mediator kerusakan jaringan (Dafriani, 2012). ROS secara umum dianggap sebagai sitotoksik dan mutagenik, yang pada kadar tinggi dapat menginduksi kematian sel, apoptosis dan penuaan. Namun, pada kadar yang rendah ROS berfungsi sebagai molekul pemberi sinyal untuk memediasi proliferasi dan migrasi sel endotel yang berkontribusi terhadap angiogenesis *in vivo* (Fukai dan Nakamura, 2008). Menurut Fukai (2006), ROS seperti superoksida ( $O_2^-$ ) dan  $H_2O_2$  mampu merangsang induksi VEGF melalui berbagai jenis sel termasuk sel otot polos pembuluh darah dan sel endotel, mendorong proliferasi dan migrasi sel, reorganisasi sitoskeletal, serta

morfogenesis pada sel endotel. Produksi ROS akibat oksidasi etanol dapat menyebabkan iskemia jaringan, sehingga tubuh akan melakukan upaya perbaikan jaringan salah satunya melalui proses pembentukan kapiler baru atau angiogenesis. Angiogenesis dipilih sebagai parameter penelitian karena pada proses penyembuhan luka, jaringan memerlukan oksigen dan nutrisi agar dapat berproliferasi dengan baik sehingga dibutuhkan suatu proses angiogenesis untuk memfasilitasi hal tersebut (Fukai, 2006).

Efek ROS tergantung pada jumlah dan produksi serta keseimbangan aktivitas enzim pro-oksidan dan antioksidan. Antioksidan dibutuhkan tubuh untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas terhadap sel normal, protein, dan lemak. Antioksidan alami banyak terkandung dalam buah dan sayuran, salah satunya kelor. Kelor (*Moringa oleifera*) telah dikenal berabad-abad sebagai tanaman multiguna padat nutrisi dan berkhasiat obat. Kelor dikenal sebagai “*miracle tree*” karena hampir semua bagian tanaman kelor dapat digunakan dalam kehidupan sehari-hari baik daun, bunga, kulit batang, biji, dan akarnya (Aminah *et al.*, 2015). Di Indonesia, pemanfaatan kelor masih belum banyak diketahui oleh masyarakat. Umumnya daun kelor hanya dimanfaatkan sebagai salah satu menu sayuran untuk dikonsumsi sehari-hari. Daun kelor diketahui mengandung 46 antioksidan kuat, seperti senyawa fenolik, flavonoid, saponin, tanin, alkaloid, vitamin A, vitamin C, vitamin E, dan mineral (Krisnadi, 2015).

Flavonoid yang banyak terkandung dalam daun kelor, seperti kaempferol dan quercetin dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan yang dapat menghambat radikal bebas dengan cara menangkap ROS, menghambat kerja enzim yang menghasilkan ROS dan membentuk kelat dengan logam-logam yang memacu terbentuknya ROS sehingga reaksi-reaksi ROS dengan sel-sel normal seperti peroksidasi lemak dan kerusakan DNA dapat dicegah atau stres oksidatif tidak terjadi lagi (Parwata, 2016). Penelitian oleh Razis *et al* (2014) menunjukkan kandungan vitamin C pada daun kelor dapat bertindak sebagai antioksidan dengan cara melakukan donor elektron sehingga dapat mencegah terbentuknya senyawa

lain dari proses oksidasi dengan melepaskan satu rantai karbon. Setelah mendonorkan elektron pada radikal bebas, vitamin C akan teroksidasi menjadi *semidehydroascorbic acid* atau *radikal ascorbic* yang relatif stabil. Reaksi tersebut dapat mereduksi radikal bebas reaktif menjadi tidak reaktif (Razis *et al.*, 2014).

Ekstrak daun kelor pada penelitian ini merupakan ekstrak etanol daun kelor. Ekstrak etanol dipilih karena menurut penelitian terdahulu oleh Chumark *et al* (2008) menunjukkan bahwa kandungan antioksidan polifenol ekstrak etanol daun kelor memiliki kemampuan menangkap (*scavenging*) radikal bebas pada studi *in vitro* serta dapat menghambat peroksidasi lipid pada percobaan *in vitro* dan *in vivo*. Dari beberapa penelitian terdahulu juga dapat diketahui dosis toksisitas ekstrak daun kelor pada hewan coba. Penelitian oleh Okechukwu *et al* (2013) diketahui dosis toksisitas ekstrak etanol (LD<sub>50</sub>) pada tikus ditemukan lebih dari 2600 mg/kg dan kurang dari 5000 mg/kgBB. Menurut penelitian Kasolo *et al* (2012) menunjukkan bahwa pemberian ekstrak aqueous daun kelor dosis LD<sub>50</sub> menyebabkan perubahan mayor pada gambaran histopatologi jaringan hati, ginjal dan jantung tikus sedangkan pemberian ekstrak etanol daun kelor LD<sub>50</sub> menyebabkan perubahan minimal pada gambaran histopatologi jaringan hari, ginjal serta jantung tikus.

Sampai saat ini, belum banyak penelitian mengenai kemampuan daun kelor sebagai antioksidan. Hal tersebut yang mendasari dilakukannya penelitian ini dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun kelor dalam proses angiogenesis pada embrio ayam yang diinduksi etanol. Pada penelitian ini, peneliti menggunakan CAM (*Chorio Allantoic Membrane*) untuk mengamati angiogenesis pada embrio ayam. Metode CAM dipilih karena membran korio alantois merupakan membran yang kaya dengan pembuluh darah yang berhubungan dengan sirkulasi embrionik. CAM juga telah banyak digunakan sebagai model penelitian *in vivo* untuk mempelajari angiogenesis (Ribatti, 2016). Metode CAM memiliki beberapa kelebihan, antara lain yaitu telur ayam berembrio mudah didapatkan, relatif murah, mudah diamati, dan masa eksperimen

lebih singkat. Selain memiliki beberapa kelebihan, penggunaan media CAM juga mempunyai kelemahan yaitu keberadaan pembuluh darah asal dan reaksi inflamasi yang tidak spesifik yang dapat menyulitkan pengamatan respon utama yang sedang diamati (Ribatti, 2016).

## **1.2 Rumusan Masalah**

Apakah pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) sebagai antioksidan dapat mempengaruhi angiogenesis pada embrio ayam yang diinduksi etanol?

## **1.3 Tujuan Penelitian**

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) sebagai antioksidan dalam proses angiogenesis pada embrio ayam yang diinduksi etanol.

## **1.4 Manfaat Penelitian**

### **1.4.1 Manfaat Teoritis**

Hasil penelitian ini diharapkan menambah rujukan informasi ilmiah mengenai potensi ekstrak daun kelor sebagai antioksidan terhadap angiogenesis pada embrio ayam yang diinduksi etanol.

### **1.4.2 Manfaat Praktis**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dan wawasan kepada masyarakat luas mengenai manfaat lain dari daun kelor.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Etanol

#### 2.1.1 Definisi Etanol

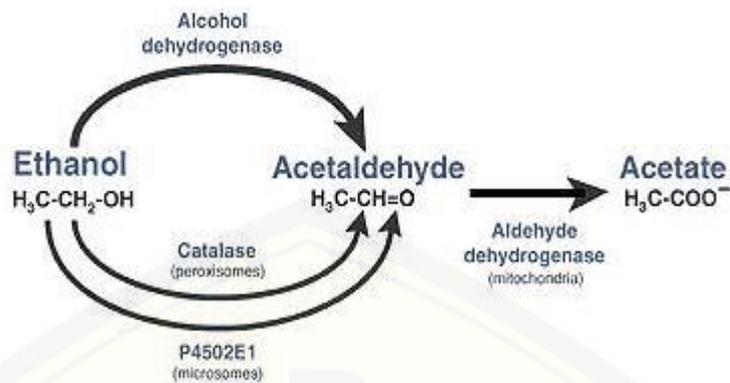
Etanol (etil alkohol,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ ) adalah hidrokarbon dengan berat molekul rendah yang berasal dari fermentasi gula. Etanol banyak beredar di masyarakat sebagai minuman, ekstrak makanan, obat batuk dan pilek, serta pembersih mulut. (Somia, 2014).

#### 2.1.2 Karakteristik Etanol

Karakteristik etanol meliputi: berupa zat cair, tidak berwarna, berbau spesifik, mudah terbakar dan mudah menguap, dapat bercampur dengan air, eter, dan kloroform. Etanol memiliki massa jenis 0.7893 g/mL. Titik didih etanol pada tekanan atmosfer adalah  $78.5^\circ\text{C}$  sedangkan titik lebur etanol adalah  $-114^\circ\text{C}$ . Indeks bias dan viskositas pada temperatur  $20^\circ\text{C}$  adalah 1.36143 dan 1.17 cP (National Pollutant Inventory, 2018).

#### 2.1.3 Metabolisme Etanol

Alkohol dimetabolisme (dapat dilihat pada Gambar 2.1) melalui beberapa proses atau jalur. Proses yang paling umum pada metabolisme etanol melibatkan 2 enzim penting ini dalam proses awal, yaitu *Alcohol Dehidrogenase* (ADH) dan *Aldehyde Dehidrogenase* (ALDH). Enzim ini membantu memecah molekul alkohol, sehingga memungkinkan alkohol untuk dieliminasi dari tubuh. Pertama, ADH memetabolisme alkohol menjadi asetaldehida ( $\text{CH}_3\text{CHO}$ ), yang merupakan zat sangat beracun dan dikenal sebagai karsinogen yang dapat merusak jaringan. Sebagian besar proses ini terjadi di hati dan reaksi ADH bersifat reversibel. Selanjutnya, asetaldehida akan dimetabolisme menjadi produk sampingan lain yang kurang aktif, yaitu asetat ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ). Asetat kemudian dipecah menjadi air ( $\text{H}_2\text{O}$ ) dan karbon dioksida ( $\text{CO}_2$ ) agar mudah dieliminasi keluar dari tubuh. (Somia, 2014).



Gambar 2.1 Metabolisme etanol (Somia, 2014)

Asetaldehida yang merupakan produk sampingan toksik dari metabolisme alkohol, diyakini sebagai zat yang dapat menyebabkan kerusakan berbagai organ. Meskipun asetaldehid berada didalam tubuh hanya dalam waktu singkat sebelum dipecah menjadi asetat, tetapi zat ini terbukti dapat menyebabkan kerusakan hepar secara nyata. Beberapa metabolisme alkohol selain terjadi di hati, juga dapat terjadi pada jaringan lain, termasuk pankreas dan otak yang dapat menyebabkan kerusakan sel dan jaringan. Selain efek toksiknya, beberapa peneliti meyakini bahwa asetaldehida bertanggung jawab atas beberapa efek perilaku dan fisiologis yang sebelumnya dikaitkan dengan alkohol. Berdasarkan hasil percobaan, ketika asetaldehida diberikan kepada hewan coba, hal tersebut dapat menyebabkan inkoordinasi, pelemahan ingatan, dan efek kantuk pada hewan coba (Somia, 2014).

#### 2.1.4 Kegunaan Etanol

Secara luas, umumnya etanol digunakan sebagai pelarut untuk zat organik maupun anorganik, bahan dasar industri asam cuka, ester, spiritus, dan asetaldehid. Dalam dunia medis, etanol digunakan sebagai bahan sterilisasi, bahan pengawet, pelarut dalam obat, dan merupakan antidotum pada keracunan metanol dan etilen glikol. Dalam kehidupan sehari-hari, etanol dapat digunakan dalam berbagai produk seperti campuran bahan bakar, bahan bakar yang terbarukan, komponen bahan pembersih, penambah rasa, industri farmasi, bahan-bahan kimia,

dan produk minuman. Etanol atau minuman beralkohol diperoleh melalui proses fermentasi karbohidrat dan ragi (Dorland dan Newman, 2010). Bahan baku dasar yang digunakan adalah biji-bijian, buah-buahan, umbi-umbian, dan gula tebu. Berdasarkan peraturan Menteri Kesehatan RI No. 86/Men.Kes/Per/IV/1977 membagi minuman beralkohol menjadi tiga jenis, yaitu golongan A (*Bir*) dengan kadar etanol 1-5%, golongan B (*Champagne, Wine*) dengan kadar etanol 5-20%, dan golongan C (*Whisky*) dengan kadar etanol 20-55% (Badan Pengawas Obat dan Makanan, 2016).

#### 2.1.5 Bahaya Etanol Terhadap Kesehatan

Penggunaan alkohol (etanol) yang tidak tepat baik dalam waktu jangka pendek maupun jangka panjang dapat berakibat fatal pada kesehatan tubuh. Beberapa bagian organ tubuh yang sering menjadi sasaran akibat paparan alkohol antara lain yaitu mata, kulit, sistem pernapasan, sistem saraf, sistem reproduksi, organ hati, dan darah. Berikut beberapa efek samping yang timbul akibat penggunaan etanol menurut Sentra Informasi Keracunan Nasional (2013), antara lain:

##### a. Paparan Jangka Pendek

Etanol dapat mengiritasi mata. Jika seseorang terhirup uap etanol dalam konsentrasi tinggi dapat menyebabkan iritasi mata dan gangguan saluran pernapasan. Paparan etanol jangka pendek juga dapat mengakibatkan gangguan pada sistem saraf seperti korban mengalami gangguan emosional, gangguan koordinasi motorik (gangguan keseimbangan, bicara kurang jelas), gangguan sensorik (vertigo, pandangan ganda), wajah kemerahan, detak jantung cepat, berkeringat, mual, muntah, mengantuk, pingsan, bahkan hingga koma. Korban juga dapat mengalami kejang-kejang yang disebabkan oleh kondisi hipoglikemia. Pada kasus keracunan etanol ringan hingga sedang, korban dapat mengalami gejala-gejala seperti rasa gembira yang berlebihan, gangguan keseimbangan, nistagmus (bola mata bergerak tidak beraturan), berkurangnya ketajaman penglihatan, hilangnya rasa malu atau batasan moral, perilaku agresif, mual,

muntah, kulit kemerahan, dan yang paling berat dapat terjadi takiaritmia supraventrikular. Sedangkan pada kasus keracunan etanol berat, korban dapat mengalami koma, depresi sistem pernapasan, aspirasi paru, hipoglikemia, dan hipotermia (Sentra Informasi Keracunan Nasional, 2013).

#### b. Paparan Jangka Panjang

Konsumsi etanol dalam jangka panjang dapat menyebabkan beberapa komplikasi yaitu, gangguan pada saluran pernapasan atas, jika kontak dengan kulit dapat menyebabkan hilangnya lapisan lemak pada kulit, dan konsumsi etanol dalam jangka waktu lama dapat menyebabkan sirosis hati. Selain dapat mengakibatkan penyakit sirosis hati, paparan etanol dalam jangka waktu lama juga dapat mengakibatkan hipertensi vena porta hepatica, akumulasi cairan pada rongga perut, perdarahan akibat varises esofagus dan hemorrhoids, hiponatremi akibat retensi cairan, dan peritonitis (Sentra Informasi Keracunan Nasional, 2013).

#### 2.1.6 Efek Induksi Etanol Pada Embrio Ayam

Etanol adalah komponen utama alkohol. Alkohol diproses dalam tubuh melalui berbagai jalur metabolisme yang akan menghasilkan produk sampingan beracun yang berkontribusi terhadap kerusakan sel dan jaringan. Paparan alkohol dapat meningkatkan kadar radikal bebas serta dapat mengurangi kadar antioksidan. Ketika kadar radikal bebas dan antioksidan tidak seimbang maka akan memicu terjadinya stress oksidatif, komponen penting dari sel akan mulai bergabung dengan radikal bebas dan dapat menyebabkan cedera sel. Secara khusus radikal bebas dapat merusak membran sel melalui proses yang disebut peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid dapat mengganggu banyak proses pengaturan penting dalam sel, termasuk kontrol atas zat yang masuk dan keluar sel, komunikasi antar sel, dan sintesis protein (Smith, 1997).

Banyak model hewan coba digunakan dalam penelitian untuk mengetahui efek pemberian etanol terhadap tingkat kelangsungan hidup (*survival rate*) hewan coba setelah diinduksi etanol, salah satunya adalah menggunakan embrio ayam. Perlakuan embrio ayam dengan etanol dilaporkan dapat mengurangi tingkat

kelangsungan hidup embrio ayam tersebut (Chaudhuri, 2004). Tingkat kelangsungan hidup embrio ayam yang diberi paparan etanol tergantung pada besar kecilnya dosis etanol yang digunakan (Laghari *et al.*, 2015). Menurut penelitian Laghari *et al* (2015), embrio ayam yang diinduksi etanol pada dosis 1% dan 5% menunjukkan tingkat kelangsungan hidupnya sedikit berkurang, sedangkan embrio ayam yang diinduksi etanol pada dosis 10% menunjukkan tingkat kelangsungan hidupnya berkurang menjadi 64% dan induksi etanol pada dosis 15% mengakibatkan kematian sebanyak 43% pada embrio ayam. Dalam penelitian Laghari *et al* (2015) juga disebutkan bahwa induksi etanol pada dosis sedang menunjukkan adanya sedikit kerusakan pembuluh darah, sedangkan induksi etanol pada dosis yang lebih tinggi >13% menunjukkan adanya hambatan perkembangan jantung pada embrio ayam dan terjadi kerusakan pembuluh darah yang nyata. Penelitian oleh Tufan dan Satiroglu-Tufan (2003) menyatakan bahwa target utama efek teratogenik akibat induksi etanol 10% dapat mengakibatkan kerusakan pembuluh darah dan plasenta pada embrio ayam. Mekanisme kerja etanol sebagai agen teratogenik belum sepenuhnya diketahui. Namun, pada penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa terbentuknya asetaldehida pada metabolisme etanol dapat menginduksi pembentukan radikal oksigen bebas dan zat antara oksigen reaktif yang dapat memicu stress oksidatif serta proses apoptosis pada kelompok sel embrio ayam yang sedang berkembang. Menurut Radek *et al* (2008) paparan etanol dapat menurunkan ekspresi reseptor VEGF-2 endotel dan juga fosforilasi reseptor VEGF-2. Secara *in vivo*, paparan etanol menyebabkan penurunan angiogenesis dan meningkatkan hipoksia pada jaringan yang rusak (Radek *et al.*, 2008).

## 2.2 Radikal Bebas

Radikal bebas adalah sekelompok bahan kimia berupa atom maupun molekul yang memiliki elektron tidak berpasangan (elektron bebas) pada lapisan luarnya. Elektron yang tidak berpasangan selalu berusaha untuk mencari pasangan baru, sehingga mudah bereaksi dengan zat lain (protein, lemak maupun DNA) dalam tubuh. Tubuh manusia mengandung molekul oksigen yang stabil dan yang

tidak stabil. Molekul oksigen yang stabil penting untuk memelihara kehidupan sel. Dalam jumlah tertentu radikal bebas diperlukan untuk kesehatan, akan tetapi radikal bebas bersifat merusak dan sangat berbahaya. Fungsi radikal bebas dalam tubuh adalah untuk melawan radang, membunuh bakteri, dan mengatur tonus otot polos dalam organ dan pembuluh darah (Giriwijoyo, 2004). Radikal bebas menyebabkan kerusakan sel dengan tiga cara (Kumar *et al.*, 2005), yaitu (a) Peroksidasi komponen lipid dari membran sel dan sitosol menyebabkan serangkaian reduksi asam lemak (otokatalisis) yang mengakibatkan kerusakan membran dan organel sel, (b) Kerusakan DNA ini dapat mengakibatkan mutasi DNA bahkan dapat menimbulkan kematian sel, (c) Modifikasi protein teroksidasi oleh karena terbentuknya *cross linking* protein, melalui mediator sulfidril atas beberapa asam amino labil seperti sistein, metionin, lisin, dan histidin. Kerusakan sel akibat reaktivitas senyawa radikal mengawali timbulnya berbagai penyakit degenerative seperti kanker, infeksi, penyakit jantung koroner, rematik, penyakit respiratorik, katarak, penyakit liver, dan penuaan (Sayuti dan Yenrina, 2015). Hal tersebut terjadi karena interaksi senyawa oksigen reaktif (ROS) atau senyawa nitrogen reaktif (RNS) dengan DNA mengawali terbentuknya DNA *adducts* selama proses perbaikan atau replikasi, yang berakibat terjadinya mutasi DNA (Sayuti dan Yenrina, 2015).

Sumber radikal bebas dapat berasal dari dalam tubuh (endogen), bisa pula dari luar tubuh (eksogen). Secara endogen, sebagai respon normal dari rantai peristiwa biokimia dalam tubuh, radikal bebas yang terbentuk dan berpengaruh di dalam sel (intrasel) maupun ekstrasel. Radikal endogen terbentuk sebagai sisa proses metabolisme (proses pembakaran) protein, karbohidrat, dan lemak pada mitokondria, proses inflamasi atau peradangan, reaksi antara besi logam transisi dalam tubuh, fagosit, xantin oksidase, peroksisom, maupun pada kondisi iskemia. Secara endogen, radikal bebas dapat timbul melalui beberapa mekanisme yaitu oto-oksidasi, aktivitas oksidasi (misalnya siklooksigenase, lipooksigenase, dehidrogenase, dan peroksidase), dan sistem transport elektron (Sayuti dan Yenrina, 2015). Sedangkan radikal bebas yang berasal dari luar (eksogen) berasal

dari pencemaran lingkungan, asap kendaraan, bahan tambahan makanan, radiasi, pestisida, limbah industri, ozon, sinar ultraviolet, asap rokok, dan alkohol (Winarsi, 2007). Salah satu jenis radikal bebas terpenting dalam tubuh yaitu radikal derivat oksigen yang disebut kelompok oksigen reaktif (*reactive oxygen species*/ROS). ROS yang berperan penting secara biologis antara lain *peroxyl radicals* (RO<sub>2</sub>) dan *hydrogen peroxide* (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Tremallen, 2008). Target utama radikal bebas adalah protein, asam lemak tak jenuh, lipoprotein, dan unsur DNA (Winarsi, 2007). Mekanisme kerusakan sel atau jaringan akibat radikal bebas yang paling awal diketahui dan banyak diteliti adalah peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid paling banyak terjadi di membran sel, terutama asam lemak tak jenuh yang merupakan komponen penting penyusun membran sel. Pengukuran tingkat peroksidasi lipid dapat diukur dengan cara mengukur produk akhirnya, yaitu *malondialdehyde* (MDA). Peroksidasi ini akan mempengaruhi fluiditas membran, struktur, dan fungsi membran (Powers dan Jackson, 2008).

### 2.3 Jejas Sel

Sel merupakan partisipan aktif di lingkungannya yang secara tetap menyesuaikan struktur dan fungsinya untuk mengakomodasi tuntutan perubahan dan stres ekstrasel. Sel cenderung mempertahankan lingkungan segera dan intraselnya dalam rentang parameter fisiologis yang relatif sempit yang bertujuan untuk mempertahankan homeostasis normalnya. Ketika mengalami stres fisiologis atau rangsang patologis, sel dapat beradaptasi mencapai kondisi baru dan mempertahankan kelangsungan hidupnya. Respon adaptasi utama adalah atrofi, hipertrofi, hiperplasia, dan metaplasia. Jika kemampuan adaptasi berlebihan, sel akan mengalami jejas. Dalam batas waktu tertentu, cedera dapat bersifat reversibel yaitu sel kembali ke kondisi stabil semula, namun dengan stres yang berat atau menetap dapat terjadi cedera irreversibel dan sel yang terkena mati (Mitchell dan Cotran, 2012).

### 2.3.1 Etiologi Jejas Sel

Stres yang dapat menginduksi jejas sel berkisar dari trauma fisik menyeluruh sampai defek gen tunggal yang menghasilkan enzim rusak yang dapat menyebabkan penyakit metabolik spesifik. Sebagian besar penyebab jejas sel dapat digolongkan menjadi kategori luas berikut ini:

#### a. Deprivasi Oksigen

Hipoksia atau defisiensi oksigen, mengganggu respirasi oksidatif aerobik dan merupakan penyebab cedera sel tersering dan terpenting yang dapat menyebabkan kematian. Hipoksia berbeda dengan iskemia. Iskemia adalah terhentinya suplai darah dalam jaringan akibat gangguan aliran darah arteri atau berkurangnya drainase vena. Iskemia merupakan penyebab tersering hipoksia, defisiensi oksigen dapat juga disebabkan oleh oksigenasi darah yang tidak adekuat atau dapat juga disebabkan karena berkurangnya kemampuan pengangkutan oksigen darah seperti pada anemia atau keracunan karbon monoksida (CO) (Mitchell dan Cotran, 2012).

#### b. Bahan Kimia

Semua bahan kimia dapat menyebabkan jejas sel, bahkan zat tidak berbahaya seperti glukosa dan garam jika terkonsentrasi cukup banyak akan merusak keseimbangan lingkungan osmotik sehingga mencederai atau menyebabkan kematian sel. Oksigen dalam tekanan yang cukup tinggi juga bersifat toksik. Bahan yang sering dikenal sebagai racun menyebabkan kerusakan serius pada tingkat selular dengan mengubah permeabilitas membran, homeostasis osmotik, dan keutuhan enzim atau kofaktor, yang dapat berakhir dengan kematian seluruh organ. Bahan berpotensi toksik lainnya yang dapat dijumpai di lingkungan sekitar meliputi polusi udara, insektisida, karbon monoksida, asbestos, dan etanol (Mitchell dan Cotran, 2012).

#### c. Agen Infeksius

Beberapa agen infeksius yang dapat menyebabkan jejas sel, yaitu virus, bakteri, cacing pita, riketsia, fungi, dan protozoa (Mitchell dan Cotran, 2012).

#### d. Reaksi Imunologi

Walaupun sistem imun melindungi tubuh dalam melawan benda asing, reaksi imun yang disengaja atau tidak disengaja dapat menyebabkan jejas sel dan jaringan. Anafilaksis terhadap protein asing atau suatu obat merupakan salah satu contoh klasik (Mitchell dan Cotran, 2012).

#### e. Defek Genetik

Defek genetik dapat menyebabkan perubahan patologis yang mencolok, seperti malformasi kongenital yang disebabkan oleh sindroma Down, atau perubahan patologis yang tak kentara, seperti substitusi asam amino tunggal pada hemoglobin S anemia sel sabit. Beberapa kesalahan metabolisme saat lahir akibat defisiensi enzimatik kongenital merupakan contoh kerusakan sel dan jaringan yang disebabkan oleh perubahan kecil pada DNA (Mitchell dan Cotran, 2012).

#### f. Ketidakseimbangan Nutrisi

Beberapa contoh ketidakseimbangan nutrisi seperti, insufisiensi kalori-protein dan defisiensi vitamin merupakan salah satu hal yang dapat memicu jejas sel. Nutrisi yang berlebihan juga merupakan penyebab penting morbiditas dan mortalitas, misalnya diabetes mellitus tipe 2. Selain itu diet kaya lemak hewani sangat bersangkut paut pada perkembangan aterosklerosis serta kerentanan terhadap banyak gangguan, termasuk kanker (Mitchell dan Cotran, 2012).

#### g. Agen Fisik

Trauma, temperatur ekstrem, radiasi, syok elektrik, dan perubahan mendadak pada tekanan atmosfer memiliki efek yang luas terhadap jejas sel (Mitchell dan Cotran, 2012).

#### h. Penuaan

Proses penuaan sel (senescence) intrinsik dapat menimbulkan perubahan kemampuan perbaikan serta replikasi sel dan jaringan. Perubahan tersebut menyebabkan penurunan kemampuan berespon terhadap rangsang dan cedera eksogen yang akhirnya menyebabkan kematian organisme (Mitchell dan Cotran, 2012).

#### 2.3.2 Mekanisme Jejas Sel

Terdapat beberapa cara berbeda untuk menginduksi jejas sel, diantaranya melalui mekanisme biokimiawi umum, jejas iskemik dan hipoksik, jejas iskemia atau reperfusi, dan jejas sel yang diinduksi radikal bebas. Jejas sel yang diinduksi oleh radikal bebas, terutama yang diinduksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) merupakan mekanisme penting kerusakan sel. Tiga reaksi yang paling relevan dengan jejas sel (dapat dilihat pada Gambar 2.2) yang diperantarai radikal bebas:

##### a. Peroksidasi lipid membran

Ikatan ganda pada lemak tak jenuh (polyunsaturated lipid) membran mudah terkena serangan radikal bebas dari oksigen. Interaksi radikal lemak menghasilkan peroksida, yang tidak stabil dan reaktif, dan terjadi reaksi rantai autokatalitik (Strayer dan Rubin, 2006).

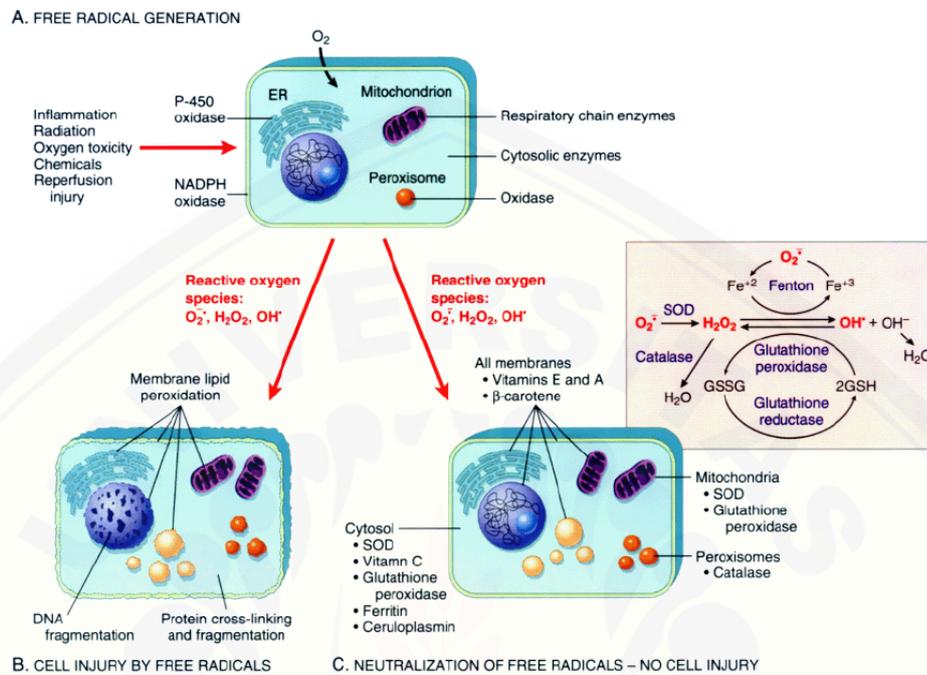
##### b. Fragmentasi DNA

Reaksi radikal bebas dengan timin pada DNA mitokondria dan nuklear menimbulkan rusaknya untai tunggal. Kerusakan DNA tersebut telah memberikan implikasi pada pembunuhan sel dan perubahan sel menjadi ganas (Strayer dan Rubin, 2006).

##### c. Ikatan silang protein

Radikal bebas mencetuskan ikatan silang protein yang diperantarai sulfhidril menyebabkan peningkatan kecepatan degradasi atau hilangnya aktivitas

enzimatik. Reaksi radikal bebas juga dapat secara langsung menyebabkan fragmentasi polipeptida (Strayer dan Rubin, 2012).



Gambar 2.2 Mekanisme jejas sel yang diinduksi radikal bebas

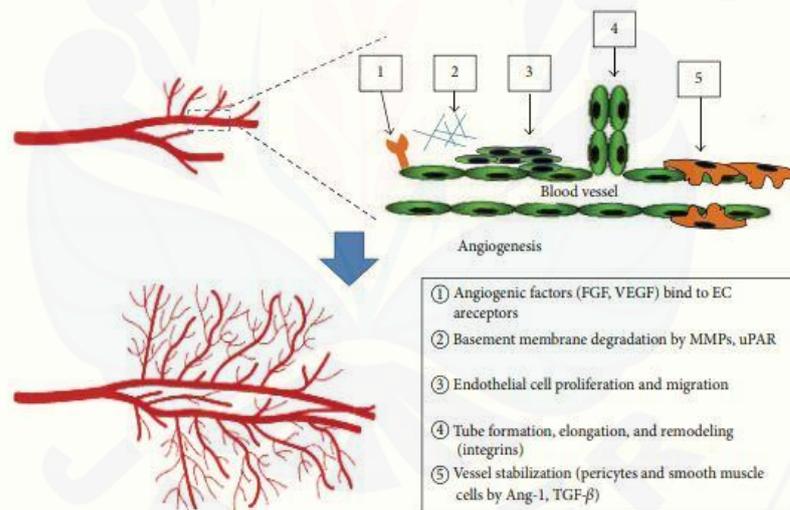
(Sumber: Robbins Buku Ajar Patologi Edisi 7, 2012)

## 2.4 Angiogenesis

Terjadinya jejas pada sel akan memicu sel untuk melakukan proses perbaikan jaringan (*tissue repair*), salah satunya melalui mekanisme pembentukan pembuluh darah baru yang sering disebut sebagai angiogenesis. Angiogenesis merupakan pertumbuhan pembuluh darah baru yang terjadi secara alami di dalam tubuh, baik dalam kondisi sehat maupun patologis (sakit) (Frisca *et al.*, 2009). Pembuluh terdiri dari dua macam. Pembuluh darah arteri yang membawa darah kaya oksigen dan nutrisi ke seluruh tubuh, dan pembuluh darah vena yang membawa darah miskin oksigen dan nutrisi dari seluruh tubuh ke jantung. Pembuluh darah terdiri dari 3 lapisan yaitu, *tunica intima*, *tunica media*, dan *tunica adventitia*. Ketiga lapisan pembuluh darah tersebut dapat mengalami regenerasi saat mengalami kerusakan dan mengalami pertumbuhan pada keadaan

penyembuhan luka dan pembentukan berbagai jaringan atau organ. Hal ini dikenal dengan sebutan angiogenesis yang berasal dari kata angio yang berarti pembuluh darah dan genesis yang berarti pembentukan (Frisca *et al.*, 2009).

Kata angiogenesis pada awalnya pada tahun 1935 untuk menjelaskan proses pembentukan pembuluh darah pada plasenta. Pada saat terjadi kerusakan jaringan, angiogenesis berperan dalam mempertahankan kelangsungan hidup dan fungsi berbagai jaringan serta organ yang mengalami kerusakan melalui terbentuknya pembuluh darah baru untuk menggantikan pembuluh darah yang telah rusak. Selain perannya dalam memperbaiki dan mempertahankan fungsi jaringan atau organ, angiogenesis juga berperan penting dalam memediasi perkembangan dan pertumbuhan embrio serta pembentukan corpus luteum dan endometrium (Frisca *et al.*, 2009). Proses angiogenesis tertera pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Proses angiogenesis (Yoo dan Kwon, 2013)

Mekanisme angiogenesis diawali dengan pelepasan dan pembentukan faktor pertumbuhan angiogenik yang berdifusi menuju sekitar jaringan yang mengalami kerusakan. Faktor pertumbuhan angiogenik tersebut, berikatan dengan reseptor spesifik endotel pada pembuluh darah terdekat dan mengaktifkan sinyal pertumbuhan dari permukaannya untuk diteruskan ke nukleus. Selanjutnya, sel-sel endotel membentuk molekul baru termasuk didalamnya berbagai enzim yang

dapat melarutkan protein dan membentuk lubang-lubang kecil pada membran basal untuk berproliferasi dan bermigrasi menuju jaringan yang rusak. Integrin yang terdapat pada permukaan membantu pembentukan dan perkembangan pembuluh darah yang baru. Enzim lain, seperti *matrix metalloproteinase* (MMP) diproduksi untuk menghancurkan jaringan yang rusak di ujung pembuluh darah baru yang sedang tumbuh. Akhirnya, sel-sel endotel yang terbentuk akan menyatu untuk saling berhubungan satu sama lain agar darah dapat bersirkulasi. Pembuluh darah baru mengalami stabilisasi melalui bantuan sel otot polos dan *pericytes* sebagai jaringan penyangga dari pembuluh darah baru yang terbentuk (Nasution *et al.*, 2009).

## **2.5 Tanaman Kelor (*Moringa oleifera*)**

### **2.5.1 Morfologi Tanaman Kelor**

Tanaman kelor (*Moringa oleifera*) merupakan tanaman yang berasal dari dataran sepanjang sub Himalaya yaitu India, Pakistan, Bangladesh, dan Afganistan. Kelor termasuk jenis tumbuhan perdu berumur panjang berupa semak atau pohon dengan ketinggian 7-11 meter dan dapat tumbuh subur mulai dari dataran rendah sampai ketinggian 700 meter diatas permukaan laut. Kelor dapat tumbuh pada daerah tropis dan subtropis pada semua jenis tanah dan tahan terhadap musim kering dengan toleransi terhadap kekeringan sampai 6 bulan (Mendieta-Araica *et al.*, 2013). Batang pohon kelor berkayu (lignosus), tegak, berwarna putih kotor, berkulit tipis dan mudah patah. Cabangnya jarang dengan arah percabangan tegak atau miring serta cenderung tumbuh lurus dan memanjang (Tilong, 2012).

Daun kelor (dapat dilihat pada Gambar 2.4) berbentuk bulat telur, bersirip tak sempurna, beranak daun gasal, tersusun majemuk dalam satu tangkai, dan hanya sebesar ujung jari. Helaiian daun kelor berwarna hijau, ujung daun tumpul, pangkal daun membulat, tepi daun rata, susunan pertulangan menyirip serta memiliki ukuran 1-2 cm (Aminah *et al.*, 2015). Bunga kelor muncul di ketiak

daun, beraroma khas dan berwarna putih kekuning-kuningan. Buah kelor berbentuk segitiga, dengan panjang sekitar 20-60 cm dan berwarna hijau. Kelor berakar tunggang, berwarna putih, berbentuk seperti lobak, berbau tajam, dan berasa pedas (Tilong, 2012).



Gambar 2.4 Daun kelor (*Moringa oleifera*) (Tilong, 2012)

### 2.5.2 Taksonomi Tanaman Kelor

Kedudukan taksonomi tanaman kelor (*Moringa oleifera*) menurut Tilong (2012) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Subkingdom	: <i>Tracheobionta</i>
Super Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Divisi	: <i>Magnoliophyta</i>
Kelas	: <i>Magnoliopsida</i>
Sub Kelas	: <i>Dilleniidae</i>
Ordo	: <i>Capparales</i>
Famili	: <i>Moringaceae</i>
Genus	: <i>Moringa</i>
Spesies	: <i>Moringa oleifera</i>

### 2.5.3 Kandungan Daun Kelor

Kelor mengandung 539 senyawa yang dikenal dalam pengobatan tradisional yaitu sebagai stimulan jantung dan peredaran darah, antitumor, antioksidan, antiinflamasi, antibakteri, antivirus, antijamur, antihipertensi, dan dapat menurunkan kolesterol. Menurut hasil penelitian Fuglie LJ (1999), daun kelor ternyata mengandung vitamin A, vitamin B, vitamin C, kalsium, kalium, besi, dan protein dalam jumlah sangat tinggi yang mudah dicerna dan diasimilasi oleh tubuh. Tidak hanya itu, kelor juga diketahui mengandung lebih dari 40 antioksidan yang dapat menangkal radikal bebas. Daun kelor menjadi sumber antioksidan alami yang baik karena kandungan berbagai jenis antioksidan seperti asam askorbat, flavonoid, saponin, tanin, alkaloid, dan karotenoid (Krisnadi, 2015).

#### a. Flavonoid

Flavonoid adalah sub kelompok senyawa polifenol yang memiliki struktur benzo- $\gamma$ -pyrone yang banyak ditemukan pada tanaman, karena disintesis sebagai respon terhadap infeksi mikroba. Flavonoid dipercaya memiliki berbagai manfaat seperti antiinflamasi, antioksidan, antivirus, antijamur, dan dapat meningkatkan kerja pembuluh darah kapiler (Marais *et al.*, 2006). Flavonoid dapat memberikan efek perlindungan terhadap fungsi endotel dan menghambat agregasi platelet, sehingga dapat menurunkan resiko penyakit kardiovaskuler dan penyakit jantung koroner (Putra *et al.*, 2016). Komponen bioaktif fenol utama daun kelor merupakan *quercetin*. *Quercetin* memperlihatkan aktivitas sebagai antioksidan dengan menurunkan peroksidasi lipid (MDA) dan meningkatkan aktivitas enzim antioksidan pada tikus yang diinduksi  $\text{CCl}_4$  (Syahrin *et al.*, 2016). *Quercetin* dapat meningkatkan fungsi kapiler tubuh dan jaringan ikat, meningkatkan kemampuan tubuh menyerap vitamin C, dan memiliki sifat antivirus (Krisnadi, 2015).

#### b. Saponin

Saponin adalah senyawa glikosida alami yang terikat dengan steroid atau triterpena. Saponin memiliki aktifitas farmakologis yang cukup banyak, yaitu antibakteri, anti-inflamasi, antioksidan, antitumor, antivirus, antijamur,

immunomodulator, efek hipoglikemik, dan efek hipokolesterol. Saponin dapat mempercepat proses regenerasi dan reepitalisasi pada proses penyembuhan luka karena bersifat imunostimulator (Putra *et al.*, 2016).

#### c. Tanin

Tanin merupakan golongan senyawa fenol yang tersebar pada banyak spesies tanaman. Tanin dilaporkan memiliki banyak manfaat, senyawa ini dikenal dapat memberikan efek proteksi terhadap predasi, sebagai pestisida, dan dapat meregulasi pertumbuhan tanaman. Dalam bidang kesehatan, tanin berfungsi sebagai antioksidan dan penghambat pertumbuhan tumor (Putra *et al.*, 2016).

#### d. Alkaloid

Alkaloid merupakan senyawa organik terbanyak yang ditemukan di alam. Alkaloid banyak dijumpai pada daun-daunan yang memiliki rasa pahit. Kegunaan senyawa ini dalam bidang farmakologis adalah sebagai senyawa stimulan saraf, obat batuk, obat tetes mata, *sedative*, obat malaria, anti kanker, dan anti bakteri. Selain itu, alkaloid dilaporkan dapat mempercepat kesembuhan luka dengan meningkatkan *Transforming Growth Factor  $\alpha 1$*  (TGF- $\alpha 1$ ) dan *Epidermal Growth Factor* (EGF) (Putra *et al.*, 2016).

## 2.6 Ekstraksi

Ekstraksi adalah salah satu teknik pemisahan kimia untuk memisahkan atau menarik satu atau komponen atau senyawa-senyawa (analit) dari suatu sampel dengan menggunakan pelarut tertentu yang sesuai (Leba, 2017). Tujuan ekstraksi adalah untuk menarik komponen kimia yang terdapat pada bahan alam. Pada ekstraksi, prinsip pemisahan didasarkan pada kemampuan atau daya larut analit dalam pelarut tertentu. Maka dari itu, pelarut yang digunakan harus mampu menarik komponen analit dari sampel secara maksimal. Mekanisme ekstraksi dimulai dengan adopsi pelarut oleh permukaan sampel, diikuti difusi pelarut ke dalam sampel dan pelarutan analit oleh pelarut. Selanjutnya terjadi difusi analit-

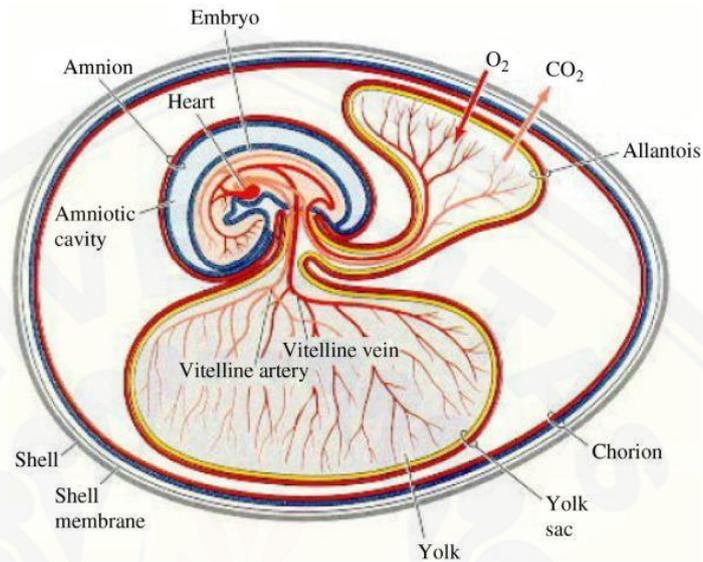
pelarut ke permukaan sampel berlangsung sangat cepat ketika terjadi kontak antara sampel dengan pelarut (Leba, 2017).

Salah satu metode yang banyak digunakan pada ekstraksi bahan alam adalah metode maserasi. Maserasi merupakan salah satu jenis ekstraksi padat cair yang paling sederhana. Proses ekstraksi dilakukan dengan cara merendam sampel pada suhu kamar menggunakan pelarut yang sesuai sehingga dapat melarutkan analit dalam sampel. Sampel biasanya direndam 3-5 hari sambil diaduk sesekali untuk mempercepat proses pelarutan analit. Ekstraksi dilakukan berulang kali sehingga analit terekstraksi secara sempurna. Indikasi bahwa semua analit telah terekstraksi secara sempurna adalah pelarut yang digunakan tidak berwarna. Kelebihan metode ini adalah alat dan cara yang digunakan sangat sederhana serta murah. Kelemahannya adalah menggunakan banyak pelarut dan membutuhkan waktu yang lama dalam pengerjaannya (Leba, 2017). Pelarut yang digunakan pada penelitian ini adalah etanol 96% dan air. Etanol dan air digunakan sebagai pelarut karena bersifat polar, universal, mudah didapat, dan mudah menguap sehingga baik digunakan sebagai pelarut ekstrak (Trifani, 2012).

## **2.7 Membran Korio Alantois Telur Ayam Berembrio**

Korion merupakan suatu selaput yang berada di bagian luar amnion dan merupakan selaput embrio terluar. Alantois adalah membran ekstraembrionik yang berasal dari mesoderm, dimana pembuluh darah primitif mulai terbentuk pada hari ke-3 inkubasi. Pada hari ke-4, alantois akan bergabung dengan epitel korion yang berasal dari ektoderm untuk membentuk CAM (*Chorio Allantois Membrane*) (Ribatti *et al.*, 1996). Terbentuknya membran CAM pada hari ke-4, diikuti pula dengan pertumbuhan pembuluh darah primitif. Pembuluh primitif akan berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sistem arteriovena sampai hari ke-8, sehingga membentuk jaringan kapiler yang bermigrasi untuk menempati area di bawah korion dan memediasi proses pertukaran gas dengan lingkungan luar (Ribatti *et al.*, 1996). Fungsi pertukaran gas sudah mulai terjadi ketika awal perkembangan embrio ayam tepatnya sebelum hari ke enam inkubasi. Selain

berfungsi untuk pertukaran gas, CAM juga berfungsi sebagai reservoir untuk produk limbah yang dikeluarkan oleh embrio yaitu urea dan asam urat. Gambar CAM dapat dilihat pada gambar 2.5.



Gambar 2.5 Chorio Allantoic Membrane (CAM) (Ribatti, 2016)

Media CAM telah lama digunakan sebagai metode penelitian *in vivo* dan *ex ovo* untuk mempelajari transplantasi jaringan, pertumbuhan tumor dan metastasis, penyembuhan luka, analisis toksikologi dan obat, serta molekul agiogenik dan anti-angiogenik (Ribatti, 2016). Penelitian angiogenesis menggunakan CAM memiliki beberapa kelebihan yaitu, pada membran CAM terdapat banyak pembuluh darah sehingga pengamatan angiogenesis mudah dilakukan, metode sederhana, dan tidak mahal (Ribatti, 2016). Namun terdapat pula kelemahan pada penggunaan metode CAM yaitu, adanya reaksi inflamasi non spesifik yang nantinya akan menyulitkan peneliti untuk mengukur respon utama yang sedang diamatai, angiogenesis positif palsu dapat terjadi akibat induksi oleh bahan uji yang menyebabkan kerusakan sel, serta CAM sangat sensitive terhadap perubahan lingkungan, seperti perubahan tekanan oksigen, pH, osmolaritas, dan banyaknya keratinisasi (Ribatti, 2016).

### 2.7.1 Perkembangan Embrio Ayam Dari Hari ke Hari

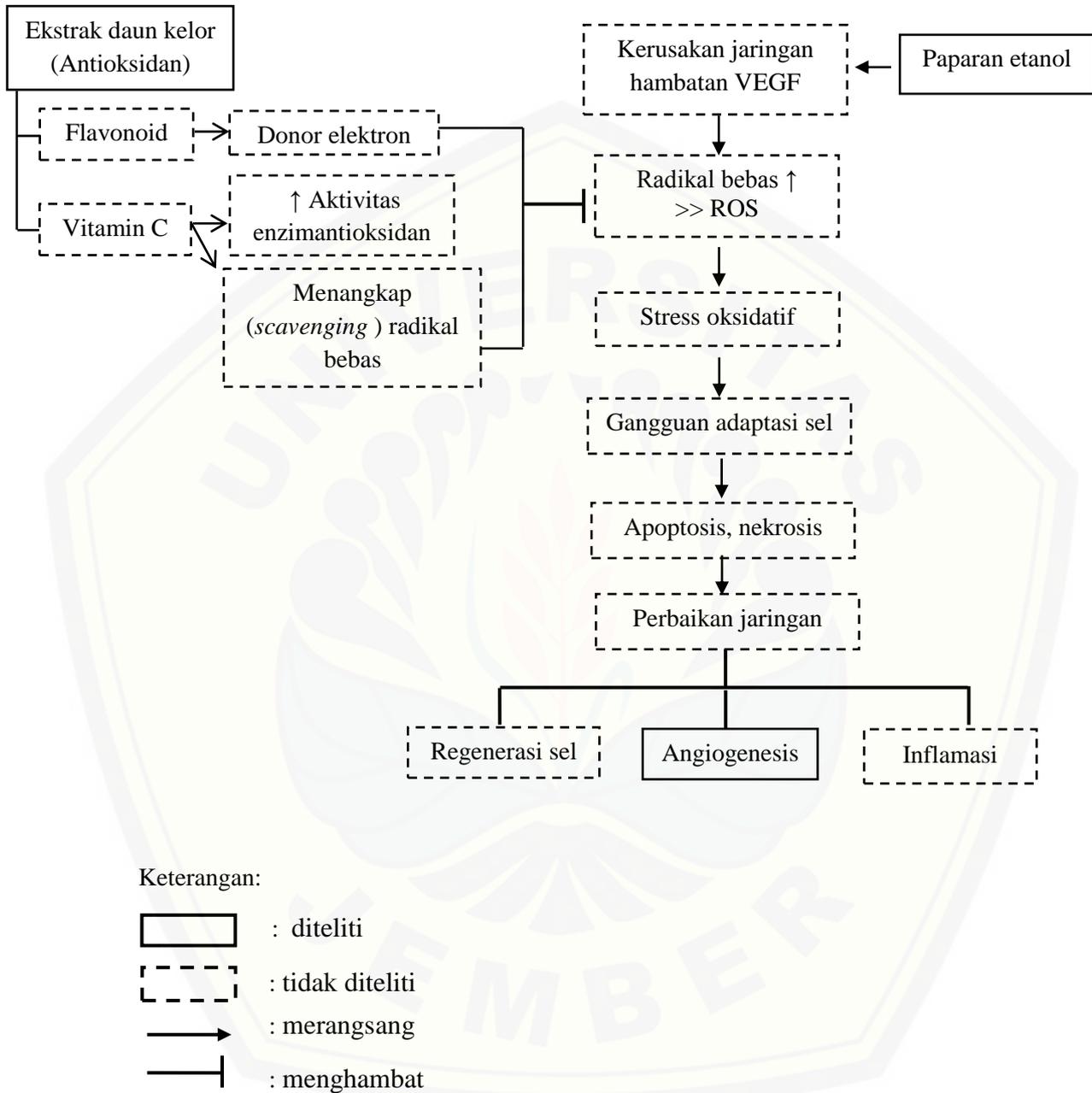
Berikut ini merupakan perkembangan embrio ayam dari hari ke hari (Anonim, 2007) sebagai berikut:

- a. Hari pertama: Asal mula lempengan embrio pada tahap blastodermal. Nampak ada rongga segmentasi yang berada di bawah area pelucida, terdapat pada cincin yang berwarna lebih gelap dari sekitarnya.
- b. Hari kedua: Nampak jalur pertama pada pusat blastoderm. Di antara extra-embryonic annexis nampak membran vitelin yang memiliki peranan utama dalam nutrisi embrio.
- c. Hari ketiga: Embrio berada di sisi kiri, dikelilingi oleh sistem peredaran darah, membran vitelin menyebar di atas permukaan kuning telur. Kepala dan badan dapat dibedakan, demikian juga otak. Nampak juga struktur jantung yang mulai berdenyut.
- d. Hari keempat: Perkembangan rongga amniotik, yang akan mengelilingi embrio, berisi cairan amniotik berfungsi untuk melindungi embrio dan membebaskan embrio bergerak. Nampak gelembung alantois yang berperan dalam penyerapan kalsium, pernapasan, dan tempat penyimpanan sisa-sisa.
- e. Hari kelima: Peningkatan ukuran embrio, embrio membentuk huruf C, kepala bergerak mendekati ekor. Terjadi perkembangan sayap.
- f. Hari keenam: Membran vitelin terus berkembang dan mengelilingi lebih dari separuh kuning telur. Fissura ada di antara jari pertama, kedua, dan ketiga dari anggota badan atas dan antara jari kedua dan ketiga anggota badan bagian bawah. Jari kedua lebih panjang dari jari lain.
- g. Hari ketujuh: Cairan yang makin mengencer di bagian leher. Nampak jelas memisahkan kepala dengan badannya. Terjadi pembentukan paruh. Otak nampak ada di daerah kepala yang lebih kecil ukurannya di banding dengan badan embrio.

- h. Hari kedelapan: Membran vitelin menyelimuti hampir seluruh kuning telur. Pigmentasi pada mata mulai nampak. Bagian paruh atas dan bawah mulai terpisah, demikian juga dengan sayap dan kaki. leher merenggang dan otak telah berada di dalam rongga kepala. Terjadi pembukaan indra pendengar bagian luar.
- i. Hari kesembilan: Kuku mulai nampak, mulai tumbuh folikel bulu pertama. Alantois mulai berkembang dan meningkatnya pembuluh darah pada vitellus.
- j. Hari kesepuluh: Lubang hidung masih sempit. Terjadi pertumbuhan kelopak mata, perluasan bagian distal anggota badan. Membran vitelin mengelilingi kuning telur dengan sempurna. Folikel bulu mulai menutup bagian bawah anggota badan. Patuk paruh mulai nampak.
- k. Hari kesebelas: Lubang palpebral memiliki bentuk elips yang cenderung menjadi encer. Alantois mencapai ukuran maksimal sedangkan vitellus makin menyusut. Embrio sudah nampak seperti anak ayam.
- l. Hari kedua belas: Folikel bulu mengelilingi bagian luar indera pendengar meatus dan menutupi kelopak mata bagian atas. Kelopak mata bagian bawah menutupi  $\frac{2}{3}$  atau bahkan bagian kornea.
- m. Hari ketiga belas: Alantois menyusut menjadi membran korio alantois. Kuku dan kaki mulai nampak jelas.
- n. Hari keempat belas: Bulu-bulu halus hampir menutupi seluruh tubuh dan berkembang dengan cepat.
- o. Hari kelima belas dan enam belas: Beberapa morfologi embrio berubah, anak ayam dan bulu halus terus berkembang. Vitellus menyusut cepat, putih telur mulai menghilang, kepala bergerak ke arah kerabang telur (posisi pipping) dibawah sayap kanan.

- p. Hari ketujuh belas: Sistem ginjal dari embrio mulai memproduksi *urates* (garam dari asam urat), paruh yang berada di bagian bawah sayap kanan, menuju rongga udara (yang ada didalam telur), dan putih telur telah terserap semua.
- q. Hari kedelapan belas: Permulaan internalisasi vitellin, terjadi pengurangan cairan amniotik. Pada umur ini dilakukan transfer dari mesin *setter* (inkubator) ke mesin *hatcher* dan juga bisa dilakukan vaksin in ovo.
- r. Hari kesembilan belas: Penyerapan vitellin secara cepat. Paruh mulai mematak selaput/membran kerabang bagian dalam dan siap untuk menembusnya, dan penyerapan vitelus mulai cepat.
- s. Hari kedua puluh: Vitelus terserap semua, menutup pusar (*umbilicus*), anak ayam menembus selaput kerabang telur bagian dalam dan bernafas pada rongga udara. Pertukaran gas terjadi melalui kerabang telur, dan anak ayam siap menetas serta mulai memecah kerabang telur.
- t. Hari kedua puluh satu: Anak ayam menggunakan sayap sebagai pemandu dan kakinya memutar balik, paruh memecah kerabang dengan cara sirkular. Anak ayam mulai melepaskan diri dari kerabang telur dalam waktu 12-18 jam dan membiarkan bulunya menjadi kering.

2.8 Kerangka Konseptual Penelitian



Gambar 2.6 Skema kerangka konseptual penelitian

Etanol adalah zat kimia berbahaya yang dapat menyebabkan kerusakan jaringan. Selain menyebabkan kerusakan jaringan, paparan etanol juga dapat menurunkan ekspresi reseptor VEGF2 endotel. Akibat paparan etanol, jaringan yang mengalami kerusakan mengalami hipoksia yang memicu terbentuknya radikal bebas dan *reactive oxygen species* (ROS). Peningkatan produksi ROS secara terus menerus dapat menyebabkan stres oksidatif. Stres oksidatif dapat menimbulkan proses iskemik, kerusakan mikrovaskular, dan kerusakan jaringan yang lebih parah. Ketika jaringan atau sel mengalami kerusakan, jaringan tersebut akan berusaha mempertahankan kelangsungan hidupnya dengan melakukan adaptasi sel. Bila adaptasi sel berhasil maka sel dapat kembali normal, sedangkan jika sel gagal melakukan adaptasi dapat memicu proses apoptosis hingga nekrosis. Jaringan yang nekrosis dapat melakukan *tissue repair* melalui beberapa cara salah satunya angiogenesis. Daun kelor diketahui mengandung berbagai macam antioksidan seperti senyawa fenol, flavonoid, saponin, dan vitamin C yang dapat menghambat radikal bebas. Flavonoid bekerja sebagai antioksidan dengan cara mencegah generasi ROS, langsung menangkap ROS atau secara tidak langsung terjadi peningkatan enzim.

## 2.9 Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian ini adalah pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) sebagai antioksidan dapat mempengaruhi angiogenesis pada embrio ayam yang diinduksi etanol.



## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian *true eksperimental* dengan rancangan penelitian *post test only control group design*.

### 3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Waktu pelaksanaan penelitian adalah bulan November 2018 – Desember 2018.

### 3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

#### 3.3.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah telur ayam berembrio usia 1 hari hasil persilangan ayam ras petelur dengan ayam kampung (Ayam Jawa Super) yang didapatkan dari UPT Produksi Pangan dan Peternakan Politeknik Negeri Jember.

#### 3.3.2 Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah telur ayam berembrio usia 1 hari yang harus memenuhi kriteria-kriteria sebagai berikut:

##### a. Kriteria Inklusi

- 1) Telur ayam fertil (diketahui melalui proses *candling*)
- 2) *Candling* hari kelima menunjukkan gambaran gelap dan bayangan pembuluh darah
- 3) Telur ayam varietas ayam jawa super

##### b. Kriteria Eksklusi

- 1) Cangkang telur rusak/retak
- 2) Tidak terbentuk embrio pada hari ke 5 saat *candling*

Sampel pada penelitian ini dipilih dari populasi menggunakan teknik *simple random sampling*, yang kemudian dibagi ke dalam 5 kelompok. Besar sampel diperoleh dari rumus Federer sebagai berikut:

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

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

$$4r-4 \geq 15$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 4,75 \approx 5$$

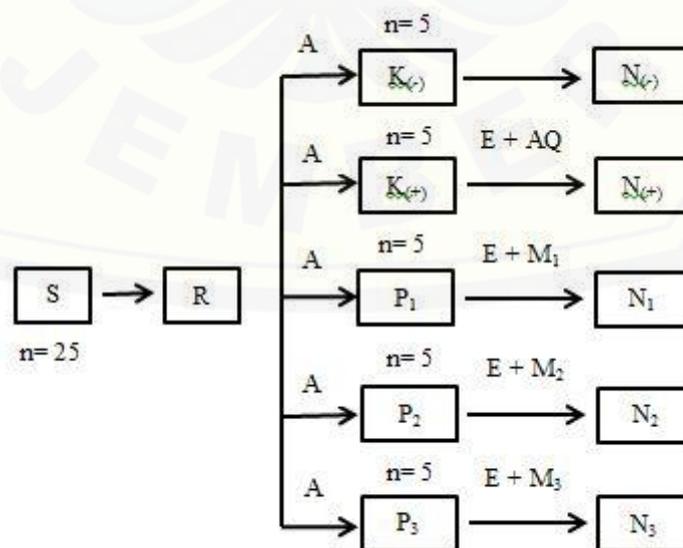
t : jumlah kelompok

r : jumlah sampel per kelompok

Besar sampel yang dibutuhkan berdasarkan perhitungan dengan rumus di atas minimal sebanyak 5 butir telur untuk masing-masing kelompok. Sehingga jumlah keseluruhan sampel pada penelitian ini adalah 25 butir telur.

### 3.4 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *post test only control group design*. Secara skematis rancangan penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian

Keterangan :

- S : Sampel  
n : Jumlah sampel  
R : Pemilihan sampel menggunakan sistem random sampling  
A : Adaptasi telur selama 3 hari  
K<sub>(-)</sub> : Kelompok kontrol negatif  
K<sub>(+)</sub> : Kelompok kontrol positif  
P<sub>1</sub> : Kelompok perlakuan 1  
P<sub>2</sub> : Kelompok perlakuan 2  
P<sub>3</sub> : Kelompok perlakuan 3  
E : Injeksi etanol 10% pada *air sac* pada hari ke-5  
AQ : Pemberian Aquades  
M<sub>1</sub> : Implantasi *paper disk* yang termuati ekstrak daun kelor 0,5 µg/ml  
M<sub>2</sub> : Implantasi *paper disk* yang termuati ekstrak daun kelor 5 µg/ml  
M<sub>3</sub> : Implantasi *paper disk* yang termuati ekstrak daun kelor 50 µg/ml  
N<sub>(-)</sub> : Jumlah pembuluh darah baru kelompok K(-)  
N<sub>(+)</sub> : Jumlah pembuluh darah baru kelompok K(+)  
N<sub>1</sub> : Jumlah pembuluh darah baru kelompok P1  
N<sub>2</sub> : Jumlah pembuluh darah baru kelompok P2  
N<sub>3</sub> : Jumlah pembuluh darah baru kelompok P3

### 3.5 Variabel Penelitian

#### 3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak daun kelor.

#### 3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis).

#### 3.5.3 Variabel Terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah suhu inkubator, fertilisasi telur ayam, tempat penyimpanan telur, dan *paper disk*.

### 3.6 Definisi Operasional

Definisi operasional diartikan sebagai definisi dari variabel yang telah dipilih peneliti. Definisi operasional memberi penjelasan bagaimana mengukur suatu variabel (Notoatmodjo, 2005). Definisi operasional dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Satuan	Skala Data
1.	Ekstrak Daun Kelor ( <i>Moringa oleifera</i> )	Ekstrak daun kelor ( <i>Moringa oleifera</i> ) adalah hasil ekstraksi dari daun kelor dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi. Ekstrak daun kelor diberikan 1 kali, bersamaan dengan implantasi <i>paper disk</i> yang telah termuat larutan ekstrak daun kelor kemudian diletakkan pada CAM telur ayam berembrio setelah 1 hari induksi etanol 10%. Dosis ekstrak daun kelor yang digunakan sebesar 0,5 $\mu$ g/ml; 5 $\mu$ g/ml; dan 50 $\mu$ g/ml.	$\mu$ g/ml	Rasio
2.	Pembentukan Pembuluh Darah Baru	Pembuluh darah baru yang dihitung adalah pembuluh darah halus dan tipis yang berada disekitar pembuluh darah utama.	-	Rasio
3.	Dosis Pemberian Etanol	Etanol yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol konsentrasi 10% diberikan sebanyak 0,25 ml pada tiap telur yang diuji. Etanol diinjeksikan pada <i>air sac</i> telur sebanyak 1 kali pada hari ke-5 menggunakan <i>disposable syringe</i> .	ml	Rasio

### 3.7 Alat dan Bahan Penelitian

#### 3.7.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah inkubator, beaker glass, pengaduk, lemari pendingin, evaporator, vortex, kertas saring, corong, *waterbath*, *disposable tube*, blender, timbangan/neraca, mikropipet, *disposable syringe*, *mini drill*, senter, kasa steril, *handscoon*, kaca pembesar, plester, gunting, kantung plastik ukuran 1kg, pisau *cutter*, dan kamera digital.

### 3.7.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah telur ayam fertil, aquades, etanol 10%, etanol 96%, ekstrak daun kelor, *paper disk*, pengawet membran CAM: formalin 10%.

## 3.8 Prosedur Penelitian

### 3.8.1 Uji Kelayakan Etik

Subjek yang digunakan dalam penelitian ini adalah telur ayam berembrio yang dalam pelaksanaannya akan mendapat sertifikat kelayakan etik dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Prosedur ini bertujuan untuk menjamin keamanan peneliti maupun objek penelitian, serta memperjelas tujuan dan kewajiban peneliti.

### 3.8.2 Pembuatan Ekstrak Daun Kelor

Daun kelor dicuci bersih dengan air kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan selama 2-4 hari. Daun kelor yang telah kering dihaluskan dengan blender sampai menjadi bubuk kemudian ditimbang. Sebanyak 1 kg bubuk daun kelor dimaserasi dalam 4L etanol 96% selama 24 jam. Kemudian disaring, residu dimaserasi kembali sampai filtrat jernih (bisa sampai 5 kali penyaringan). Setelah jernih, filtrat dikumpulkan menjadi satu kemudian dimasukkan ke dalam evaporator untuk dipekatkan dengan *vacuum evaporator* pada suhu 30-40°C dan tekanan 75 mmHg selama 10 jam dan diuapkan dengan *waterbath* untuk menguapkan etanolnya sampai kental selama 7 hari. Ekstrak disimpan dalam botol sampel steril dalam suhu -2°C.

### 3.8.3 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Daun Kelor

- a. Membuat dosis 500 µg/ml (Larutan A), yaitu dengan 20 ml aquades ditambah dengan 10 mg ekstrak daun kelor kemudian dihomogenisasi dengan vortex.
- b. Untuk membentuk dosis 50 µg/ml (Larutan B), larutan A diambil sebanyak 1 ml kemudian ditambah aquades 9 ml dalam *disposable tube*.

- c. Untuk menghasilkan dosis 5  $\mu\text{g/ml}$  (Larutan C), larutan B diambil sebanyak 1 ml kemudian ditambah aquades 9 ml dalam *disposable tube*.
- d. Untuk menghasilkan dosis 0,5  $\mu\text{g/ml}$  (Larutan D), larutan C diambil sebanyak 1 ml kemudian ditambah aquades 9 ml dalam *disposable tube*.

#### 3.8.4 Tahap Perlakuan Terhadap Media Telur Ayam

- a. Telur berusia 1 hari disucihamakan menggunakan alkohol 70%.
- b. Kemudian telur diinkubasi selama 3 hari pada suhu 37°C dengan kelembaban 60-70%. Setelah 3 hari diinkubasi, telur diteropong (*candling*) menggunakan senter untuk mengetahui ada tidaknya embrio.
- c. Telur diinjeksi etanol 10% ke dalam *air sac* keseluruhan telur. Lubang tempat injeksi ditutup dengan plester.
- d. Telur diinkubasi kembali selama 24 jam.
- e. Ke dalam telur diimplantasikan *paper disk* yang telah termuati ekstrak daun kelor sebanyak 100  $\mu\text{l}$  dengan konsentrasi yang telah dibuat, yaitu 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$ , dan 50  $\mu\text{g/ml}$ .
- f. Lubang pada telur ditutup menggunakan kassa steril kemudian direkatkan dengan plester.
- g. Setelah diberi perlakuan, telur diinkubasi kembali selama 3 hari pada suhu 37°C. Pada hari ke-9, buka penutup lubang pada telur kemudian fiksasi menggunakan formalin 10% sehingga menutupi seluruh kerabang udara selama 10 menit di lemari pendingin kemudian membran dikeluarkan dari telur dan dipisahkan dari embrionya sambil ditetesi formalin 10% hingga pembuluh darah intak. Kemudian simpan di inkubator dengan suhu 37°C dengan direndam sedikit formalin 10%.
- h. Setelah proses fiksasi membran korio alantois, ambil gambar pembuluh darah dengan kamera digital untuk diamati secara makroskopis.

### 3.8.5 Tahap Pengamatan

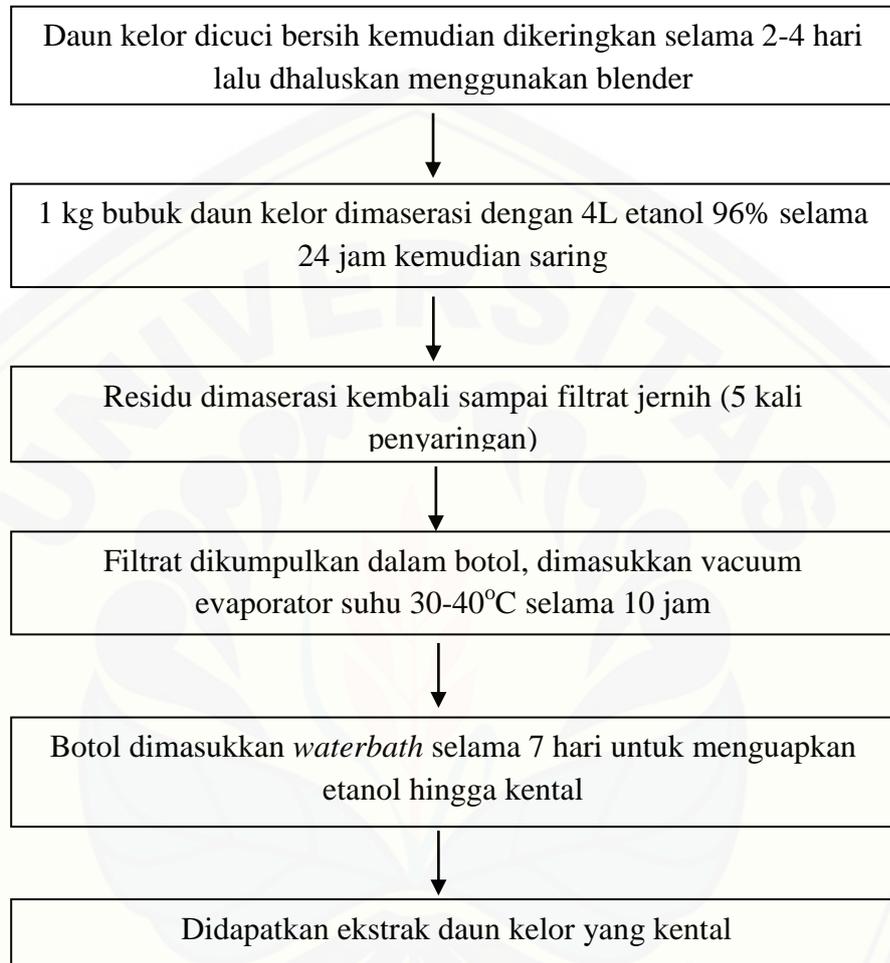
Pengamatan dilakukan secara makroskopis dengan bantuan kaca pembesar, yaitu dengan cara menghitung jumlah pembuluh darah baru pada *paper disk* dan disekitar *paper disk* yang melekat pada CAM. Cabang pembuluh darah yang halus dan kecil adalah pembuluh darah yang dihitung. Pengamatan terhadap pembuluh darah baru pada *paper disk* dan disekitar *paper disk* harus dibedakan dengan pembuluh darah utama dari CAM. Pembuluh darah utama pada CAM memiliki ukuran lebih besar sedangkan pembuluh darah baru yang terbentuk lebih halus dan berukuran kecil (Ribatti *et al.*, 2006).

### 3.9 Analisis Data

Data yang diambil pada penelitian ini adalah banyaknya pembuluh darah baru yang terbentuk pada *paper disk* dan disekitar *paper disk*. Data dianalisis menggunakan program SPSS versi 16. Sebelum dilakukan analisis data, terlebih dahulu dilakukan uji normalitas menggunakan uji *Saphiro Wilk* karena jumlah jumlah sampel <50 kemudian dilanjutkan uji homogenitas menggunakan uji *Levene*. Data yang diperoleh terdistribusi normal dan homogen, maka dilanjutkan dengan uji *One Way Anova* ( $p < 0,05$ ) dan dilakukan analisis *Post Hoc*.

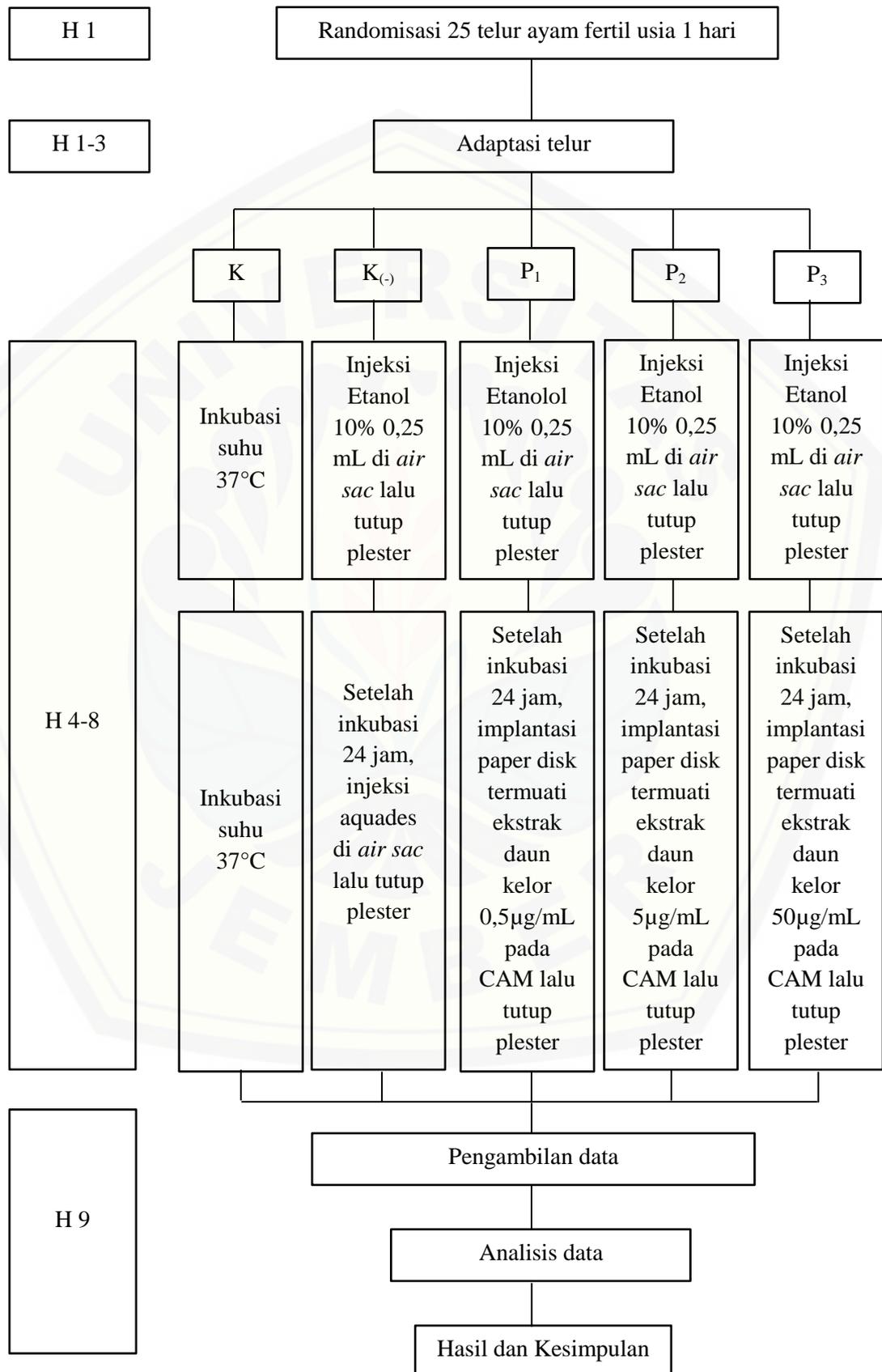
### 3.10 Alur Penelitian

#### 3. 10.1 Pembuatan Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*)



Gambar 3.2 Skema pembuatan ekstrak daun kelor

3.10.2 Perlakuan Pada Membran Korio Alantois Embrio Ayam



Gambar 3.3 Skema perlakuan terhadap telur ayam

## **BAB 5. PENUTUP**

### **5.1 Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak daun kelor berpengaruh terhadap perbaikan angiogenesis pada embrio ayam yang diinduksi etanol.

### **5.2 Saran**

Berdasarkan kesimpulan di atas, maka saran yang dapat diberikan oleh peneliti yaitu.

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk melakukan isolasi senyawa untuk mengetahui senyawa spesifik yang memiliki aktivitas pro angiogenesis dalam daun kelor.
2. Perlu dilakukan penelitian dengan dosis yang lebih tinggi sehingga didapatkan respon angiogenesis yang maksimal.
3. Perlu dilakukan penelitian dengan menggunakan metode lain yang lebih akurat, seperti pemeriksaan imunohistokimia VEGF untuk mengamati pembuluh darah baru secara lebih detail.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aminah, S., Ramdhan, T., dan Yanis, M. 2015. Kandungan Nutrisi dan Sifat Fungsional Tanaman Kelor (*Moringa oleifera*). *Buletin Pertanian Perkotaan*. 5(2): 35-39.
- Anderson, P. 2012. The Impact of Alcohol on Health. World Health Organization Regional Office for Europe.
- Andjani, N., Sujuti, H., dan Winarsih, S. 2016. Efek Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) Terhadap Nuclear Factor Kappa Beta (NF-kB) Aktif dan Apoptosis Cell Line Kanker MCF-7. *Majalah Kesehatan FKUB*. 3(4): 204-207.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan. 2016. *Standar Keamanan dan Mutu Minuman Beralkohol*. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor 14 Tahun 2016. Jakarta: Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia.
- Berning, J.E., Bernhardson, N., Coleman, K., Farhat, D.A., Gushrowski, C.M., Lanctot, A., Maddock, B.H., Michels, K.G., Mugge, L.A., Nass, C.M., Yearsley, S.M., dan Miller Jr, R.R. 2013. Ethanol and/or Taurine Induced Oxidative Stress in Chick Embryos. *Journal of Amino Acids*. 24(5): 1-2.
- Buletin CP Service Pokphand. 2007. Perkembangan Embrio Dari Hari Ke Hari. No. 87. Jakarta Maret 2007. Halaman 1-4.
- Chaudhuri, J. D. 2004. Alcohol and The Developing Fetus. *Med Sci Monit*. 6(5): 1035.
- Chumark, P., P. Khunawat., dan Y. Sanvarinda. 2008. The in vitro and ex vivo Antioxidant Properties, Hypolipidemic and Antiatherosclerotic Activities of Water and Ethanolic *Moringa oleifera* Lam Leaves Extract. *J Ethnopharmacol*. 11(6): 799.
- Dharani, S., Pabba, S., dan MadhusudanRao, Y. 2014. Evaluation of Biological Activities Using Ethanolic Crude Extract of *Moringa oleifera*. *Octa Journal of Biosciences*. 2(2): 91-93.
- Dorland, W. A., dan Newman. 2010. *Kamus Kedokteran Dorland*. Edisi 31. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Edwinanto, L., Septiadi, E., Nuffaizah, L. R., Anastasya, K. S., dan Pranata, N. 2018. Phytochemical Features of *Moringa oleifera* Leaves as Anticancer. *Journal of Medicine and Health*. 2(1): 681-685.

- Fadilah. 2018. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) Terhadap Penyembuhan Luka Pada Mencit. *Skripsi*. Medan: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sumatera Utara.
- Fang, Y. Z., Yang, S., dan Wu, G. 2002. Free Radicals, Antioxidant, and Nutrition. *Nutrition Journal*. 18(10): 872.
- Federal University of Triangulo Mineiro. 2012. *Angiogenesis in Wound Healing*. Brazil: Intechopen.
- Frisca, C. T. Sardjono., dan F. Sandra. 2009. Angiogenesis: Patofisiologi dan Aplikasi Klinis. *JKM*. 8(2): 174-175.
- Fukai, M. U. 2006. Redox Signaling in Angiogenesis: Role of NADPH Oxidase. *Cardiovascular Research*. 71(1): 227.
- Fukai, M. U., dan Y. Nakamura. 2008. Reactive Oxygen Species and Angiogenesis: NADPH Oxidase as Target For Cancer Therapy. *Cancer Letters*. 266(1): 38-39.
- Gado, P. V., Salokhe, S. G., dan Deshpande, S. G. 2016. Biochemical Changes Induced by Bioneem (0.03%) Formulation in Chick Embryogenesis (*Gallus domesticus*). *International Journal of Environmental and Agriculture Research*. 2(10): 151-152.
- Kasolo, J. N., G. S. Bimenya., L. Ojok., dan J. W. Ogwal-Okeng. 2012. Sub-acute Toxicity Evaluation of *Moringa oleifera* Leaves Aqueous and Ethanol Extract in Swiss Albino Rats. *International Journal of Medicinal Plant Research*. 1(6): 76-78.
- Kou, X., Li, B., Olayanju, J.B., Drake, J.M., dan Chen, N. 2018. Nutraceutical or Pharmacological Potential of *Moringa oleifera* Lam. *Nutrients*. 10(343): 1-12.
- Krisnadi, A. D. 2015. Kelor Super Nutrisi. Blora: KELORINA.
- Kue, C. S., Tan, K. Y., Lam, M. L., dan Lee, H. B. 2015. Chick Embryo Chorioallantoic Membrane (CAM): An Alternative Predictive Model in Acute Toxicological Studies for Anti-Cancer Drugs. *Japanese Association for Laboratory Animal Science*. 64(2): 129.
- Kumar, I., Staton, C. A., Cross, S. S., Reed, M. W. R., dan Brown, N. J. 2009. Angiogenesis, Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptors in Human Surgical Wounds. *Wiley Online Library*. 96(12): 1-2.
- Laghari, Z. A., Samo, A. A., Waryani, B., Palh, Z. A., Lashari, K. L., Mastoi, G. M., Sahato, G. A., dan Ursani, T. J. 2015. Effect of Single Dose of Ethanol on Survival Rate and Angiogenesis of Chick Embryo. *Animal and Veterinary Sciences*. 3(1): 8-10.

- Leba, M. A. 2017. *Ekstraksi dan Real Kromatografi*. Sleman: DeePublish.
- Mendieta-Araica, B., Spornly, E., Reyes-Sanchez, N., Salmeron-Miranda, F., dan Halling, M. 2013. Biomass Production and Chemical Composition of *Moringa oleifera* Under Different Planting Densities and level of Nitrogen Fertilization. *Agroforest Syst.* 87: 81-92.
- Mitchell, R. N., dan Cotran, R. S. 2012. *Robbins Buku Ajar Patologi Volume 1*. Edisi 7. Jakarta: EGC.
- Mukhriani, 2014. Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, dan Identifikasi Senyawa Aktif. *Jurnal Kesehatan.* 7(2): 361-362.
- Nasution, A. I., H. Joenes., dan L. A. Leepel. 2009. Antiangiogenesis Angiostatin pada Terapi Gen Kanker. *M.I.Kedokteran Gigi.* 24(4): 185.
- National Institute On Alcohol Abuse and Alcoholism. 2007. *Alcohol Metabolism: An Update*. USA: NIAAA Publications Distribution Center.
- National Pollutant Inventory. 2018. *Ethanol (ethyl alcohol)*. Australia: Australian Government Department of the Environment and Energy.
- Notoatmodjo, S. 2005. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta: PT Rineka Cipta.
- Okechukwu, U., N. Okwesili., J. Parker., B. Abubakar., O. Emmanuel., dan O. Christian. 2013. Phytochemical and Acute Toxicity Studies of *Moringa Oleifera* Ethanol Leaf Extract. *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research.* 2(2): 68-69.
- Paravicini, T. M., dan R. M. Touyz. 2008. NADPH oxidase, Reactive Oxygen Species, and Hypertension. *Journal Diabetes Care.* 31(20): 170-180.
- Parwata, O. A. 2016. *Antioksidan Obat Tradisional*. Bali: Universitas Udayana Press.
- Peifer, C. dan Dannhardt, G. 2004. A Novel Quantitative Chick Embryo Assay as an Angiogenesis Model Using Digital Image Analysis. *Anticancer Research.* 24: 1545.
- Putra, D. P., Dharmayudha, G. O., dan Sudimartini, L. M. 2016. Identifikasi Senyawa Kimia Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa oleifera L*) di Bali. *Indonesia Medicus Veterinus.* 5(5): 465-466.
- Putri, E. A. K. 2017. Pengaruh Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) Terhadap Kecepatan Angiogenesis Paska Ekstraksi Gigi Tikus Wistar. *Skripsi*. Surabaya: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga.

- Radek, K. A., E. J. Kovacs., R. L. Gallo., dan L. A. DiPietro. 2008. Acute Ethanol Exposure Disrupts VEGF Receptor Cell Signaling in Endothelial Cells. *American Physiological Society*. 86(25): 174-175.
- Radek, K. A., A. M. Matthies., A. L. Burns., S. A. Heinrich., E. J. Kovacs., dan L. A. DiPietro. 2005. Acute Ethanol Exposure Impairs Angiogenesis and Proliferative Phase of Wound Healing. *American Physiological Society*. 289(1): 1084-1089.
- Razis, A. F., M. D. Ibrahim., dan S. B. Kntayya. 2014. Health Benefit of *Moringa oleifera*. *Asian Pasific Journal of Cancer Prevention*. 15: 8571-8573.
- Ribbati, D., Vacca, A., Roncali, L., dan Dammacco, F. 1996. The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane As A Model for *in vivo* Research on Angiogenesis. *Technical Note*. 40(11): 1189-1193.
- Ribbati, D. 2016. The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane (CAM) A Multifaceted Experimental Model. *Elsevier*. 14(1): 70-77.
- Sargowo, D. 2015. *Disfungsi Endotel*. Malang: Universitas Brawijaya Press.
- Sayuti, K., dan R. Yenrina. 2015. *Antioksidan Alami dan Sintetik*. Padang: Andalas University Press.
- Sentra Informasi Keracunan Nasional, 2013. *Ethanol*. Jakarta: Sentra Informasi Keracunan Nasional.
- Siddhuraju, P. 2003. Antioxidant Properties of Various Solvent Extracts of Total Phenolic Constituents From Three Different Agroclimate Origins of Drumstick Tree (*Moringa oleifera* Lam.) Leaves. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 51: 2144-2155.
- Smith, S. M. 1997. Alcohol Induced Cell Death in The Embryo. *Alcohol Health and Research World*. 21(4): 293.
- Somia, A. 2014. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Jilid I*. Edisi VI. Jakarta: Interna Publishing.
- Sotyati. 2016. Kelor, Dinobatkan WHO Sebagai Pohon Ajaib. <http://www.satuharapan.com/read-detail/read/kelor-dinobatkan-who-sebagai-pohon-ajaib>. [Diakses pada 26 Oktober 2018].
- Strayer, D. S., dan E. Rubin. 2006. *Cell Injury*. Elsevier.
- Syahrin, S., C. Kairupan., dan L. Loho. 2016. Gambaran Histopatologik Hati Tikus Wistar yang Diberi Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) Setelah Diinduksi Karbon Tetraklorida (CCl<sub>4</sub>). *Jurnal e-Biomedik (eBm)*. 4(2): 4-5.
- Tilong, A. D. 2012. *Ternyata, Kelor Penakluk Diabetes*. Jogjakarta: DIVA Press.

- Tremallen, K. 2008. Oxidative Stress and Male Infertility – A Clinical Perspective. *Human Reproduction Update*.
- Tufan, A. C., dan N. L. Satiroglu-Tufan. 2003. The Effect of Ethanol Exposure on Extraembryonic Vascular Development in the Chick Area Vasculosa. *Cells Tissues Organs*. 175: 84-79.
- Universitas Jember. 2016. *Pedoman Penulisan Karya Ilmiah*. Jember: UPT Penerbitan Universitas Jember.
- Verma, A. R., M. Vijayakumar., C. S. Mathela., C. V. Rao. 2009. In vitro and in vivo Antioxidant Properties of Different Fractions of Moringa oleifera Leaves. *Food Chemical Toxicology*. 47: 2196.
- Wang, G., S. Zhong., S. Zhang., Z. Ma., J. Chen., W. Lu., X. Cheng., M. Chuai., K. Lee., D. Lu., dan X. Yang. 2015. Angiogenesis is Repressed by Ethanol Exposure During Chick Embryo Development. *Journal of Applied Toxicology*. 36: 696-697.
- Widayati, E. 2012. Oxidasi Biologi, Radikal Bebas, dan Antioxidant. *Jurnal Unissula*. 50(128): 1-2.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius.
- WHO, 2010. *Global Status Report on Alcohol and Health*. World Health Organization
- Yoo, S. Y., dan S. M. Kwon. 2013. Angiogenesis and Its Therapeutic Opportunities. *Hindawi Journal*. 2013: 1-2.

LAMPIRAN

Lampiran 3.1 Pembuatan Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*)



Daun kelor dikeringkan



Daun kelor dihaluskan



Serbuk halus daun kelor



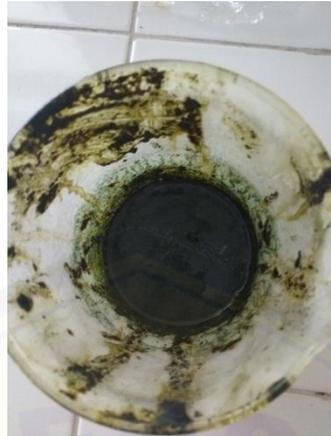
Maserasi



Penyaringan ekstrak



Evaporasi ekstrak dengan *waterbath*



Hasil ekstrak daun kelor

### Lampiran 3.2 Perlakuan Telur Ayam Berembrio



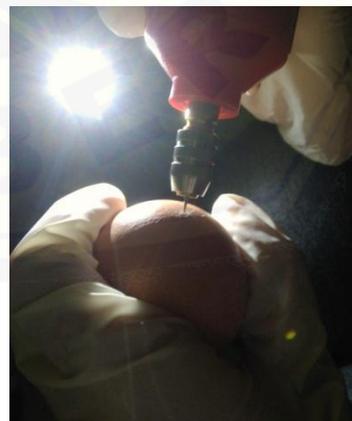
Adaptasi telur ayam fertil



*Candling* telur ayam



Desinfeksi telur ayam



Melubangi *air sac* telur dengan *mini drill*



Induksi etanol



Induksi ekstrak dan implantasi *paper disk*



**Lampiran 3.3 Persetujuan Etik Penelitian**

KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
KOMISI ETIK PENELITIAN  
Jl. Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877 Jember  
68121 – Email : fk\_unej@telkom.net

**KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK**  
*ETHICAL APPROVA*

Nomor : (.272/H25.1.11/KE/2018

Komisi Etik, Fakultas Kedokteran Universitas Jember dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul :

*The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Jember University, With regards of the protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled :*

**PENGARUH EKSTRAK DAUN KELOR (*Moringa aleifera*) TERHADAP ANGIOGENESIS PADA EMBRIO AYAM**

Nama Peneliti Utama : Britta Fatika Sari.  
*Name of the principal investigator*

NIM : 152010101026

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember  
*Name of institution*

Dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.  
*And approved the above mentioned proposal.*

Jember, 14 Desember 2018  
Ketua Komisi Etik Penelitian  
  
Rini Riyanti, Sp.PK  


**Tanggapan Anggota Komisi Etik**

(Diisi oleh Anggota Komisi Etik, berisi tanggapan sesuai dengan butir-butir isian diatas dan telaah terhadap Protokol maupun dokumen kelengkapan lainnya)

*Review Proposal* :

- Mohon diperhatikan pemilihan jenis telur yang akan dipakai dalam penelitian
- Mohon diperhatikan penyimpanan ethanol 10% yang akan digunakan dalam penelitian untuk mengurangi bias penelitian.
- Mohon diperhatikan kontrol kualitas pembuatan ekstrak daun kelor agar didapatkan kontrol yang diinginkan.
- Mohon diperhatikan kamera digital yang digunakan harus sesuai, type yang sama dan resolusi yang sama untuk digunakan mengambil gambar pembuluh darah pada semua sampel penelitian.
- Mohon diperhatikan penyimpanan Formalin 10% yang akan digunakan dalam penelitian.
- Mohon diperhatikan suhu lemari pendingin yang digunakan untuk pengambilan membrane CAM untuk penelitian.
- Mohon diperhatikan pembuangan limbah medis dan limbah B3 agar tidak mencemari lingkungan.

Mengetahui  
Ketua Komisi Etik Penelitian  
  
dr. Rini Riyanti, Sp.PK

Jember, 12 Desember 2018  
Reviewer

  
dr. Ayu Munawaroh Aziz, M.Biomed.

**Lampiran 3.4 Rekomendasi Bebas Plagiasi**

KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
Jl. Kalimantan I/37 Kampus Tegal Boto. Telp. (0331) 337877, Fax (0331) 324446  
Jember 68121.

**REKOMENDASI BEBAS PLAGIASI**

Nomor : 58 /H25.1.11/KBSI/2019

Komisi bimbingan Skripsi dan Ilmiah, Fakultas Kedokteran Universitas Jember dalam upaya peningkatan kualitas dan originalitas karya tulis ilmiah mahasiswa berupa skripsi, telah melakukan pemeriksaan plagiasi atas skripsi yang berjudul :

**PENGARUH EKSTRAK DAUN KELOR (*Moringa oleifera*) TERHADAP ANGIOGENESIS PADA EMBRIO AYAM**

Nama Penulis : Britta Fatika Sari  
NIM. : 152010101026  
Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Telah menyetujui dan dinyatakan "BEBAS PLAGIASI"

Surat Rekomendasi ini dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 25 Januari 2019

Komisi Bimbingan Skripsi & Ilmiah

Ketua



Dr. dr. Yunita Armiyanti, M.Kes  
NIP. 19740604 200112 2 002

**Lampiran 4.1 Hasil Uji Normalitas Data (*Saphiro Wilk*)****Tests of Normality**

	Grup	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Jumlah pembuluh darah	K(-)	.209	5	.200*	.948	5	.721
	K(+)	.184	5	.200*	.950	5	.738
	P1	.310	5	.131	.871	5	.272
	P2	.181	5	.200*	.963	5	.827
	P3	.391	5	.012	.796	5	.075

a. Lilliefors Significance Correction

\*. This is a lower bound of the true significance.

**Lampiran 4.2 Hasil Uji Homogenitas Data (*Levene*)****Test of Homogeneity of Variance**

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Jumlah pembuluh darah	Based on Mean	2.203	4	20	.105
	Based on Median	1.481	4	20	.246
	Based on Median and with adjusted df	1.481	4	15.643	.256
	Based on trimmed mean	2.245	4	20	.100

**Lampiran 4.3 Hasil Uji *One Way* ANOVA****ANOVA**

Jumlah pembuluh darah

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2748.240	4	687.060	37.018	.000
Within Groups	371.200	20	18.560		
Total	3119.440	24			

Lampiran 4.4 Hasil Uji *Post-Hoc* LSD

## Multiple Comparisons

Jumlah pembuluh darah

LSD

(I) Grup	(J) Grup	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K(-)	K(+)	30.8000*	2.7247	.000	25.116	36.484
	P1	22.4000*	2.7247	.000	16.716	28.084
	P2	16.2000*	2.7247	.000	10.516	21.884
	P3	10.2000*	2.7247	.001	4.516	15.884
K(+)	K(-)	-30.8000*	2.7247	.000	-36.484	-25.116
	P1	-8.4000*	2.7247	.006	-14.084	-2.716
	P2	-14.6000*	2.7247	.000	-20.284	-8.916
	P3	-20.6000*	2.7247	.000	-26.284	-14.916
P1	K(-)	-22.4000*	2.7247	.000	-28.084	-16.716
	K(+)	8.4000*	2.7247	.006	2.716	14.084
	P2	-6.2000*	2.7247	.034	-11.884	-.516
	P3	-12.2000*	2.7247	.000	-17.884	-6.516
P2	K(-)	-16.2000*	2.7247	.000	-21.884	-10.516
	K(+)	14.6000*	2.7247	.000	8.916	20.284
	P1	6.2000*	2.7247	.034	.516	11.884
	P3	-6.0000*	2.7247	.040	-11.684	-.316
P3	K(-)	-10.2000*	2.7247	.001	-15.884	-4.516
	K(+)	20.6000*	2.7247	.000	14.916	26.284
	P1	12.2000*	2.7247	.000	6.516	17.884
	P2	6.0000*	2.7247	.040	.316	11.684

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.