



**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN KELOR
(*Moringa oleifera Lamk.*) TERHADAP KADAR
AST DAN ALT PADA EMBRIO AYAM
YANG DIINDUKSI ALKOHOL**

SKRIPSI

Oleh

**Fais Dina Artika
NIM. 152010101027**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2019**



**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN KELOR
(*Moringa oleifera Lamk.*) TERHADAP KADAR
AST DAN ALT PADA EMBRIO AYAM
YANG DIINDUKSI ALKOHOL**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Pendidikan Strata Satu Fakultas Kedokteran
dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran

Oleh

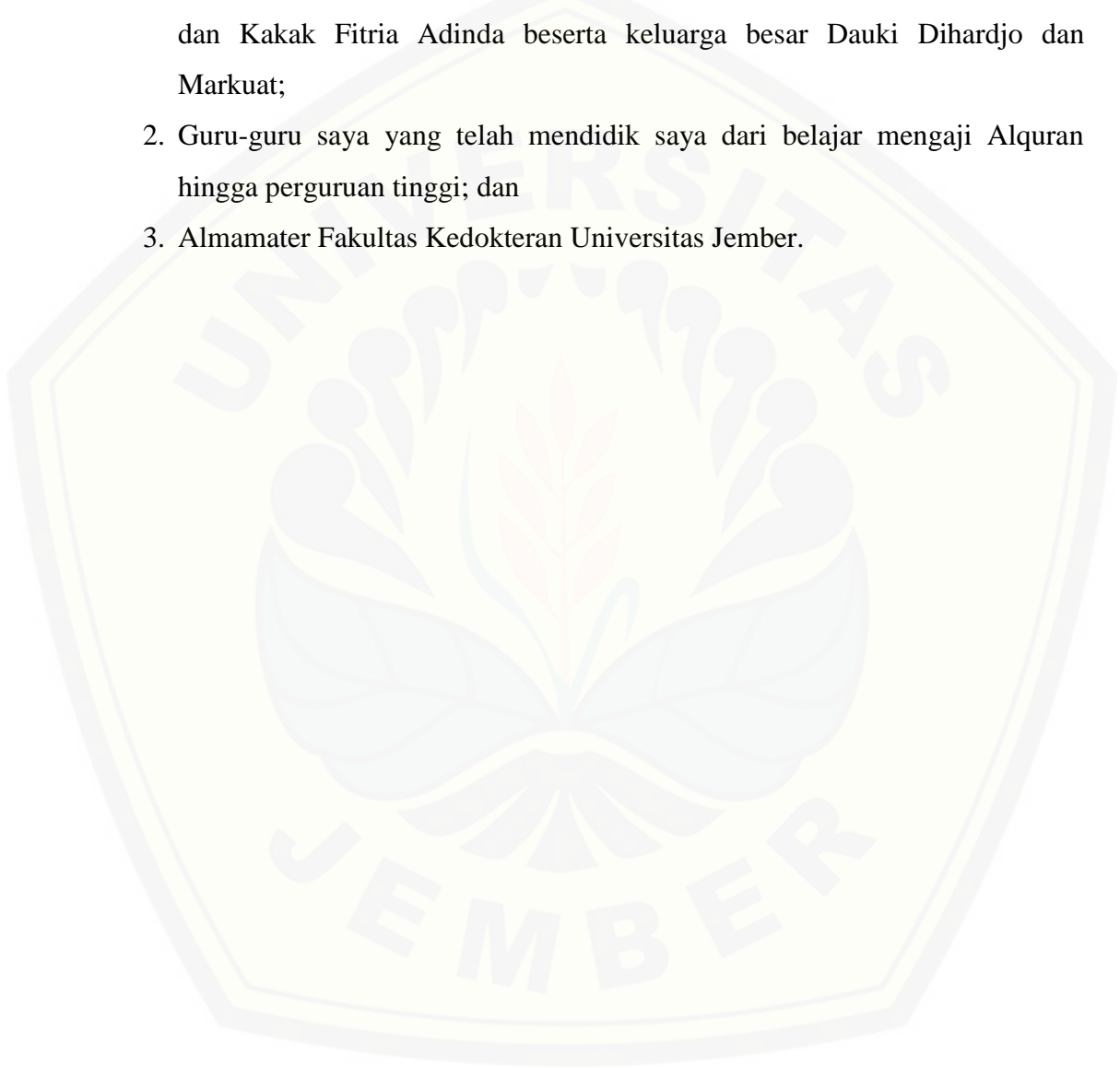
Fais Dina Artika
NIM. 152010101027

FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2019

PERSEMBAHAN

Dengan segala puji syukur kepada Allah SWT, saya persembahkan skripsi ini kepada:

1. Keluargaku, Ayahanda Lasdar, Ibunda Sriyanah, Kakak Hendra Legatawa, dan Kakak Fitria Adinda beserta keluarga besar Dauki Dihadjo dan Markuat;
2. Guru-guru saya yang telah mendidik saya dari belajar mengaji Alquran hingga perguruan tinggi; dan
3. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.



MOTTO

“Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal”
(Terjemahan surat *Ali ‘Imran* ayat 190^{*})



^{*}) Departemen Agama Republik Indonesia. 2014. Al Qur'an dan Terjemahannya. Surakarta: Ziyad Books

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Fais Dina Artika

NIM : 152010101027

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera Lamk.*) terhadap Kadar AST dan ALT pada Embrio Ayam yang Diinduksi Alkohol” 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, 16 Januari 2019
Yang menyatakan,

Fais Dina Artika
NIM 152010101027

SKRIPSI

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN KELOR
(*Moringa oleifera Lamk.*) TERHADAP KADAR
AST DAN ALT PADA EMBRIO AYAM
YANG DIINDUKSI ALKOHOL**

Oleh

**Fais Dina Artika
152010101027**

Pembimbing

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

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Heni Fatmawati, M.Kes, Sp.Rad.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Kelor (*Moringa Oleifera Lamk.*) terhadap Kadar AST dan ALT pada Embrio Ayam yang Diinduksi Alkohol” karya Fais Dina Artika telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Tim Penguji:

Ketua,

dr. Rini Riyanti, Sp.PK.
NIP. 197203281999032001

Anggota II,

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

Anggota I

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

Anggota III,

dr. Heni Fatmawati, M.Kes., Sp.Rad.
NIP. 197602122005012001

Mengesahkan
Dekan,

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

RINGKASAN

Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) terhadap Kadar AST dan ALT pada Embrio Ayam yang Diinduksi Alkohol; Fais Dina Artika; 152010101027; 2015; 34 Halaman; Fakultas Kedokteran Universtas Jember.

Pada tahun 2010 angka kematian sirosis hati mencapai 1,5 juta orang di dunia dengan 1 juta diantaranya mempunyai riwayat hepatitis dan kanker hati. Di Indonesia, faktor risiko sirosis yaitu konsumsi alkohol masih kurang mendapat perhatian. Pada tahun 2007 tercatat remaja Indonesia yang mengkonsumsi alkohol sebanyak 4,9% dan meningkat pada tahun 2014 menjadi 14,4%. Alkohol menyebabkan kerusakan hati dengan memproduksi ROS. ROS menyebabkan kerusakan hati dengan berbagai mekanisme. Kerusakan ini kemudian akan ditandai salah satunya kenaikan kadar AST dan ALT di ekstrasel. AST dan ALT merupakan enzim yang terlibat metabolisme di sel hati. Daun kelor merupakan tanaman potensial sumber antioksidan. Kandungan flavonoid dan asam askorbat diduga menjadi penyebab aktivitas antioksidannya. Embrio ayam merupakan model yang baik untuk bidang toksikologi dan embriologi. Embrio ayam merupakan model yang murah dan mudah dimanipulasi.

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun kelor dalam mencegah kerusakan yang diinduksi alkohol melalui pengamatan kadar AST dan ALT. Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental* dengan design penelitian *postest only control group design* yang dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Daun kelor diekstraksi menggunakan teknik maserasi dengan etanol 96% selama 24 jam. Ekstrak kemudian dievaporasi hingga kental dan disimpan pada lemari pendingin. Sampel penelitian merupakan telur berembrio usia tujuh hari yang didapatkan dari UPT Peternakan Politeknik Negeri Jember sebanyak 25 butir. Pemilihan dan pengelompokan telur dilakukan dengan *simple random sampling*. Telur dikelompokkan menjadi 5 kelompok yaitu KN, KP, P1, P2, dan P3. Telur diinkubasi pada suhu 37,5°C dengan kelembapan 70-80%. Pada hari ke-12

melalui kantung udara telur KN diinjeksi 250 μ l normal saline, KP, P1, P2, dan P3 diinjeksi 250 μ l etanol 10%. Pada hari ke-13, diinjeksi masing-masing 100 μ l normal saline pada KP, ekstrak daun kelor 0,5 μ g/ml pada P1; ekstrak daun kelor 5 μ g/ml pada P2; dan ekstrak daun kelor 50 μ g/ml pada P3. Pada hari ke-15 telur dipecahkan dan diambil amnionnya untuk diukur kadar AST dan ALT.

Data yang diperoleh diuji menggunakan *One way ANOVA* dan *Post hoc LSD*. Uji *One way ANOVA* menunjukkan perbedaan antar kelompok yang signifikan pada AST ($p=0,001$) dan ALT ($p=0,002$). Sehingga dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak daun kelor berpengaruh terhadap kadar AST dan ALT embrio ayam yang diinduksi alkohol.

Ekstrak daun kelor dapat menurunkan kadar AST dan ALT embrio ayam yang diinduksi alkohol. Ekstrak daun kelor memiliki berbagai kandungan yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan seperti asam galat, flavonoid, quercetin, vitamin B2, vitamin C dan vitamin E. Kandungan ekstrak daun kelor dapat berperan menjadi donor elektron pada ROS yang dihasilkan oleh metabolisme alkohol pada embrio ayam yang ditandai dengan adanya penurunan kadar AST dan ALT embrio ayam.

PRAKATA

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT, yang memberkahi dan mempermudah jalan penulis dalam menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera Lamk.*) terhadap Kadar AST dan ALT pada Embrio Ayam yang Diinduksi Alkohol” skripsi disusun untuk memenuhi syarat menyelesaikan pendidikan strata program studi pendidikan dokter di Universitas Jember. Selama penyusunan skripsi penulis mendapat banyak bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak. Oleh karena itu penulis ingin mengucapkan terimakasih kepada:

1. dr. Suryono, Sp.JP. FIHA dan dr. Heni Fatmawati, M. Kes, Sp.Rad. selaku dosen pembimbing yang telah memberikan bimbingan, motivasi, kesabaran, dan waktu kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini;
2. dr. Rini Riyanti, Sp.PK dan dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dan kritik yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
3. Analis Laboratorium Biokimia Universitas Jember Nurul Istinaroh A.md;
4. Keluarga penulis Bapak Lasdar, Ibu Sriyanah, Kakak Hendra, dan Kakak Dinda tercinta yang selalu sabar mendengar keluh kesah penulis dan memberi motivasi kepada penulis;
5. Rekan penelitian penulis, dr. Indah Kusumawardani, Britta Fatika Sari dan Nabela Karima Putri;
6. Murabbi saya Intan W. Prabandari dan Dina Faizatur R.;
7. Teman dari berbagai masa Endah, Firna, Reni, Yulia, Vera, dan Anggareta;
8. Teman-teman Jombel (Desi, Nafa, Puput, Wasil, Umi, Warda, dan Itul), teman kos (Yesika, Dian, Nimas, Mala, Fitri, Ardhia, Meta dan Isa).
9. Seluruh teman-teman sejawat Coccyx, dan IMSAC; dan
10. Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan penulisan karya tulis ini yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis berharap semoga Allah membalas kebaikan yang telah diberikan dan penelitian ini dapat memberikan manfaat tidak hanya kepada penulis tetapi juga pembaca.

Jember, 16 Januari 2019

penulis



DAFTAR ISI

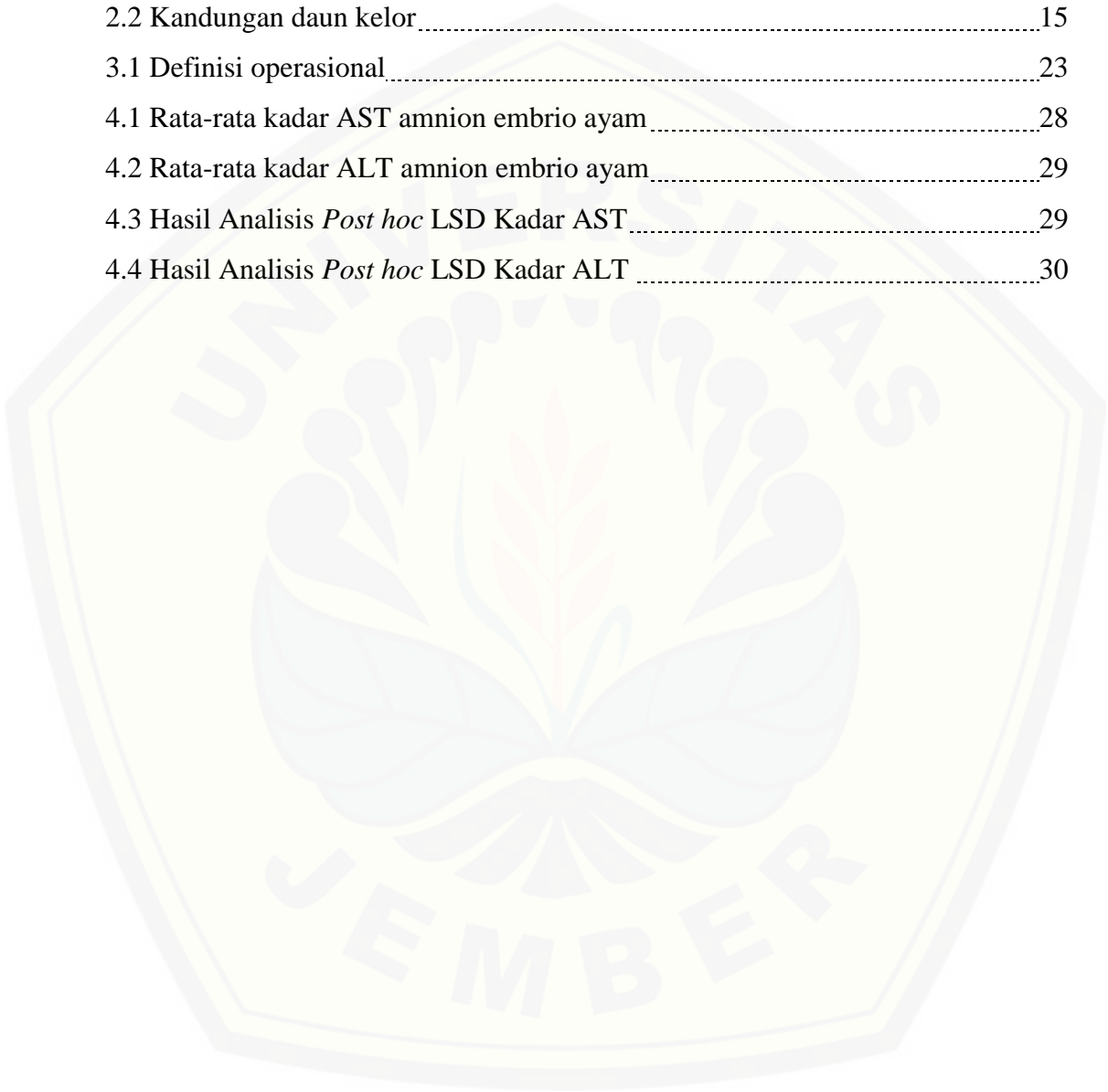
	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	vi
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.3.1 Tujuan Umum.....	3
1.3.2 Tujuan Khusus	3
1.4 Manfaat	3
1.4.1 Manfaat Teoritis.....	3
1.4.2 Manfaat Aplikatif.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 AST dan ALT.....	4
2.1.1 AST dan ALT sebagai Penanda Kerusakan.....	4
2.1.2 Pengukuran Kadar AST dan ALT	5
2. 2 Embrio Ayam sebagai Hewan Coba Induksi Alkohol	6
2.2.1 Klasifikasi Hewan Coba	6
2.2.2 Perkembangan Hati Embrio Ayam	7

2.2.3 Induksi Alkohol pada Embrio Ayam	8
2.2.4 Cairan Amnion Embrio Ayam	11
2.3 <i>Candling</i>	11
2.4 Kelor	12
2.4.1 Klasifikasi dan Morfologi Tanaman Kelor	12
2.4.2 Kandungan Tanaman Kelor	14
2.4.3 Fitokimia Daun Kelor	16
2.6 Ekstraksi.....	17
2.7 Kerangka Konseptual	18
2.8 Hipotesis	20
BAB 3. METODE PENELITIAN	20
3.1 Jenis Penelitian	20
3.2 Rancangan Penelitian.....	20
3.3 Tempat dan Waktu Penelitian	20
3.4 Populasi dan Sampel Penelitian	21
3.4.1 Populasi Penelitian.....	21
3.4.2 Sampel Penelitian	21
3.4.3 Jumlah Sampel.....	21
3.4.4 Kriteria Inklusi dan Eksklusi	21
3.5 Variabel Penelitian	22
3.5.1 Variabel Bebas	22
3.5.2 Variabel Terikat	22
3.5.3 Variabel Terkendali	22
3.6 Definisi Operasional	23
3.7 Alat dan Bahan	24
3.7.1 Alat.....	24
3.7.2 Bahan	24
3.8 Prosedur Penelitian	24
3.8.1 Pembuatan Ekstrak Daun Kelor.....	24
3.8.2 Pengenceran Ekstrak Etanol Daun Kelor.....	25
3.8.3 Tahap Perlakuan terhadap Telur Ayam	25

3.8.4 Tahap Pengambilan Cairan Amnion Sampel.....	26
3.8.5 Tahap Pengukuran Kadar AST dan ALT Sampel	26
3.9 Analisis Data	27
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN.....	28
4.1 Hasil	28
4.1.1 Hasil Ekstraksi	28
4.1.2 Hasil Kadar AST pada Amnion Embrio Ayam	28
4.1.3 Hasil Kadar ALT Amnion Embrio Ayam.....	28
4.2 Analisis Data	29
4.2.1 Analisis Kadar AST Amnion Embrio Ayam	29
4.2.2 Analisis Kadar ALT Amnion Embrio Ayam.....	30
4.3 Pembahasan	31
5. PENUTUP.....	34
5.1 Kesimpulan	34
5.2 Saran.....	34
DAFTAR PUSTAKA	35

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Kandungan kelor.....	14
2.2 Kandungan daun kelor.....	15
3.1 Definisi operasional.....	23
4.1 Rata-rata kadar AST amnion embrio ayam.....	28
4.2 Rata-rata kadar ALT amnion embrio ayam.....	29
4.3 Hasil Analisis <i>Post hoc</i> LSD Kadar AST.....	29
4.4 Hasil Analisis <i>Post hoc</i> LSD Kadar ALT.....	30



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Perkembangan hati embrio ayam	8
2.2 Anatomi suplai darah embrio ayam	9
2.3 Metabolisme alkohol di hati	10
2.4 Anatomi telur	11
2.5 Hasil <i>candling</i>	12
2.6 Tanaman kelor	13
2.7 Kerangka konseptual	18
3.1 Skema rancangan penelitian	20

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
3.1 Skema Alur Ekstraksi Daun Kelor	43
3.2 Skema Pengenceran Ekstrak Daun Kelor	44
3.3 Skema Alur Perlakuan	45
3.4 Tahapan Pengukuran AST dan ALT Sampel	46
3.5 Skema Jadwal Perlakuan	47
4.1 Keterangan Persetujuan Etik	48
4.2 Hasil Pengukuran Kadar AST dan ALT	50
4.3 Analisis Data	51
4.4 Rekomendasi Bebas Plagiasi	56
4.5 Dokumentasi	57

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kerusakan hati masih menjadi masalah global yang signifikan. Pada tahun 2010 angka kematian sirosis hati mencapai 1,5 juta orang di dunia. Satu juta diantaranya disebabkan oleh kanker hati dan hepatitis (Mokdad *et al*, 2014). Di Indonesia, hepatitis masih mendapat perhatian utama sebagai penyebab sirosis hepatis. Padahal selain hepatitis, konsumsi alkohol merupakan faktor risiko sirosis hati dan hepatoma (Patasik *et al*, 2015). Data riset kesehatan dasar menunjukkan prevalensi nasional peminum alkohol mencapai 4,6% pada tahun 2007 sedangkan, riset oleh Gerakan Nasional Anti Miras tahun 2014 menunjukkan 23% dari 14,4 juta remaja Indonesia mengkonsumsi alkohol dan angka kematian akibat konsumsi alkohol mencapai 50 orang perhari. Angka ini meningkat dibanding hasil riset kesehatan dasar tahun 2007 untuk remaja yang mengkonsumsi alkohol, yakni 4,9% (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2008; Setyawan, 2015; Hendri dan Setyawati, 2017).

Alkohol menyebabkan kerusakan hati dengan memproduksi *reactive oxygen species* (ROS). Produksi ROS dalam jumlah yang besar akan menyebabkan kerusakan sel hati dengan berbagai macam mekanisme seperti mengaktifasi sel kupfer untuk memproduksi sitokin menyebabkan inflamasi jangka panjang hati dan berinteraksi dengan membran sel menyebabkan gangguan fungsi membran sel (Muriel, 2009). Kerusakan ini kemudian ditandai oleh salah satunya kenaikan *aspartate transaminase* (AST) dan *alanine transaminase* (ALT) di ekstrasel. AST dan ALT merupakan enzim transaminase yang terlibat dalam metabolisme asam amino sel hati dan pemeriksaan yang umum dilakukan untuk mengetahui kerusakan hati (Kwo *et al*, 2017).

Beberapa tahun terakhir kandungan alami tumbuhan seperti flavonoid, terpenoid dan steroid mendapat perhatian khusus oleh peneliti karena aktivitas antioksidan (Das *et al*, 2018). Kelor (*Moringa oleifera Lamk.*) merupakan tanaman yang sangat sering dimanfaatkan oleh masyarakat Indonesia seperti sebagai bahan makanan, pakan ternak, dan hiasan taman. (Isnain dan Muin, 2017).

Kelor merupakan tanaman potensial sumber antioksidan karena memiliki kandungan asam askorbat dan flavonoid (Stohs dan Hartman, 2015). Hal ini ditunjang beberapa studi seperti studi oleh Pari dan Kumar (2002) yang menunjukkan bahwa ekstrak daun kelor dapat melindungi hati tikus dari obat antitubercular, dan studi oleh El-bakry *et al.* (2016) yang menunjukkan efek hepatoprotektif daun kelor terhadap karbon tetraklorida pada mencit. Studi oleh Saalu *et al.* (2012) ekstrak daun kelor mampu melindungi hati tikus *wistar* yang induksi alkohol.

Dari uraian diatas, peneliti tertarik untuk meneliti efek pemberian ekstrak daun kelor terhadap kerusakan akibat alkohol dengan model penelitian menggunakan embrio ayam. Embrio ayam merupakan model yang baik untuk digunakan pada penelitian bidang embriologi dan toksikologi. Embrio ayam dijadikan sebagai salah satu model nonklinis dalam pengembangan obat-obatan sebagai skrining awal pengembangan obat baru. Embrio ayam dinilai memberikan model yang sensitif untuk mengevaluasi efek toksin terhadap berat badan, perkembangan organ dan kerusakan oksidatif (Kurantowicz *et al.*, 2017). Penelitian tentang sifat protektif tumbuhan gelang biasa melawan kerusakan yang diinduksi sisplastin oleh Sudhakar *et al.* (2010) telah dilakukan di embrio ayam dengan salah satu parameternya adalah AST dan ALT. Selain itu embrio ayam merupakan model penelitian yang murah, efisien, dan mudah dimanipulasi (Yokouchi, 2005). Dari uraian diatas peneliti ingin melakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun kelor terhadap kadar AST dan ALT pada embrio ayam yang diinduksi alkohol.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian diatas, maka permasalahan yang dapat dirumuskan yaitu apakah pemberian ekstrak daun kelor berpengaruh terhadap kadar AST dan ALT embrio ayam yang diinduksi alkohol?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun kelor dalam menghambat kerusakan yang diinduksi alkohol melalui pengamatan kadar AST dan ALT.

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus penelitian ini adalah mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun kelor terhadap kadar AST dan ALT pada embrio ayam yang diinduksi alkohol.

1.4 Manfaat

1.4.1 Manfaat Teoritis

Penelitian ini diharapkan menambah rujukan informasi ilmiah tentang potensi ekstrak daun kelor dalam menghambat kenaikan AST dan ALT embrio ayam.

1.4.2 Manfaat Aplikatif

Penelitian ini diharapkan mampu menjadi informasi dalam pemanfaatan ekstrak daun kelor dalam menghambat kenaikan AST dan ALT

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 AST dan ALT

2.1.1 AST dan ALT sebagai Penanda Kerusakan.

AST merupakan enzim yang memiliki aktifitas tertinggi di mitokondria dan sitosol sel hati. AST berperan sebagai pengkatalis konversi aspartat dan alfa-ketoglutarat menjadi oxaloasetat dan glutamat. AST tidak hanya diproduksi di sel hati, tetapi juga dihasilkan sel lain seperti sel otot, dan jantung. Meskipun tidak spesifik pada sel hati pengukuran kadar AST di ekstrasel menjadi penilaian yang baik untuk melihat proses nekrosis yang terjadi pada sel hati. Pada sirkulasi AST dapat bertahan 2-3 hari (Engelking, 2011).

ALT merupakan enzim yang berada di sitosol sel hati. Berfungsi sebagai enzim yang mengkatalisis proses transfer gugus amino alanin ke alfa-ketoglutarat untuk membentuk piruvat dan glutarat. Meskipun pada dasarnya ALT juga diproduksi sel lain, ALT merupakan penanda spesifik kerusakan hati dan proses hepatotoksisitas. ALT memiliki waktu paruh 2-4 jam (Engelking, 2011; Araghi *et al*, 2016).

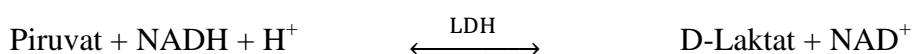
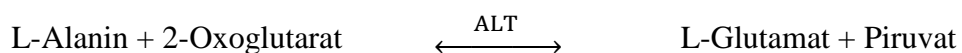
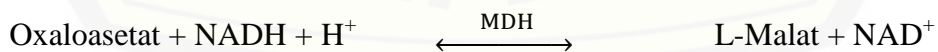
Kadar AST dipengaruhi oleh umur, ras, obesitas, penggunaan obat-obatan dan kondisi hati, sistem bilier, otot serta jantung. Sedangkan kadar ALT dipengaruhi oleh umur, ras, obesitas, penggunaan obat-obatan dan kondisi hati serta sistem bilier (Conigrave *et al*, 2003). Pada kerusakan hati yang akut seperti Hepatitis, AST akan lebih tinggi dari pada ALT, namun setelah 24-48 jam kerusakan hati, AST akan turun sehingga konsentrasinya lebih rendah dari pada ALT. Pada keadaan kronis, AST lebih rendah dari pada ALT. Ketika terjadi fibrosis ALT biasanya menurun, kemudian rasio AST ke ALT secara bertahap meningkat. Pada sirosis AST seringkali lebih tinggi dari ALT (Kim *et al*, 2008).

Pada embrio ayam, kedua enzim transaminase sudah dihasilkan sebelum hari kedelapan, hal ini dibuktikan oleh percobaan yang dilakukan oleh Sheid dan Hirschburg (1967) untuk mendeteksi keberadaan enzim tersebut dengan mengisolasi hati embrio ayam. Kadar AST hati pada usia embrio 15 hari mencapai 4-5 U/L sedangkan kadar ALT mencapai 1-2 U/L. Pengukuran kadar

AST dan ALT embrio ayam pun digunakan untuk mengetahui kerusakan hati embrio seperti pada penelitian Araghi *et al.* (2016) yang meneliti tentang hepatotoksisitas sulfadiazine pada embrio ayam. Dalam penelitian ini terjadi peningkatan AST dan ALT disertai perubahan morfologi dari hati embrio ayam. Pada penelitian lain, AST dan ALT juga digunakan sebagai parameter toksisitas peptisida pada embrio ayam (Gado *et al.*, 2016).

2.1.2 Pengukuran Kadar AST dan ALT

Terdapat beberapa metode untuk mengukur kadar enzim AST dan ALT seperti metode *Reitman-Frankel* yang digunakan untuk mengukur kadar AST dan ALT dan metode kinetik enzimatik sesuai *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (IFCC). Dibandingkan dengan IFCC metode *Reitman-Frankel* membutuhkan waktu yang lebih lama (Reitman dan Frankel, 1957). Metode IFCC ini mengukur aktivitas enzim yang diinginkan melalui absorbansi cahaya yang dilewatkan melalui spektrofotometer pada panjang gelombang 340 nm. Reagen yang digunakan dalam pengukuran AST dan ALT dengan metode ini masing-masing terdiri dari dua macam reagen. Reagen satu untuk AST terdiri dari TRIS pH 7.65, L-aspartat, malate dehidrogenase (MDH), dan laktat dehidrogenase, serta reagen dua terdiri dari 2-oxoglutarate dan NADH. Sedangkan reagen satu untuk ALT terdiri dari TRIS pH 7,15 L-alanine, dan laktat dehidrogenase, serta reagen keduanya yaitu 2-oxoglutarat dan NADH. Adapun prinsip metode ini adalah sebagai berikut :



Pada beberapa kasus penambahan piridoksal fosfat diperlukan dalam reaksi sebagai kofaktor dan menyetabilkan reaksi yang terjadi (Triyati, 1985; Sardini

2007). Metode IFCC juga diterapkan pada spesimen bukan serum seperti cairan amnion. Satu studi oleh khosravi *et al.* (2018) menggunakan kit komersial yang biasa digunakan untuk cek rutin laboratorium untuk mengukur AST dan ALT pada embrio ayam.

2. 2 Embrio Ayam sebagai Hewan Coba Induksi Alkohol

2.2.1 Klasifikasi Hewan Coba

Hewan coba merupakan hewan yang digunakan sebagai sarana untuk mempelajari dan mengembangkan ilmu pengetahuan melalui penelitian. Penelitian mengenai kandidat obat-obatan baru memerlukan studi nonklinis berupa uji toksikologi dan farmakologi sebagai skrining awal untuk dilanjutkan pada studi selanjutnya. Skrining awal dalam fase eksplorasi pengembangan obat baru membutuhkan model yang efisien dan murah yang cocok serta penanda biokimia, dan morfologi yang dapat dinilai. Ini akan meningkatkan kemungkinan obat yang berhasil dalam fase selanjutnya dari studi nonklinis. Salah satu model potensial dalam hal ini adalah embrio ayam. Selain itu, embrio ayam memberikan gambaran perkembangan yang cukup lengkap, masa inkubasinya pendek, dan dapat dimanipulasi serta dikateterisasi (Bjørnstad *et al.*, 2018). Ayam jawa super merupakan hasil perkawinan silang ayam kampung dengan ayam ras petelur dan termasuk dalam spesies ayam kampung (*Gallus gallus domesticus*). Ketersediaan ayam varietas ini cukup banyak dan mudah didapat (*International Labour Organization*, 2013). Adapun klasifikasi ayam kampung menurut Wikipedia adalah sebagai berikut :

Kingdom : Animalia

Filum : Chordata

Kelas : Aves

Ordo : Galliformes

Famili : Phasianidae

Genus : Gallus

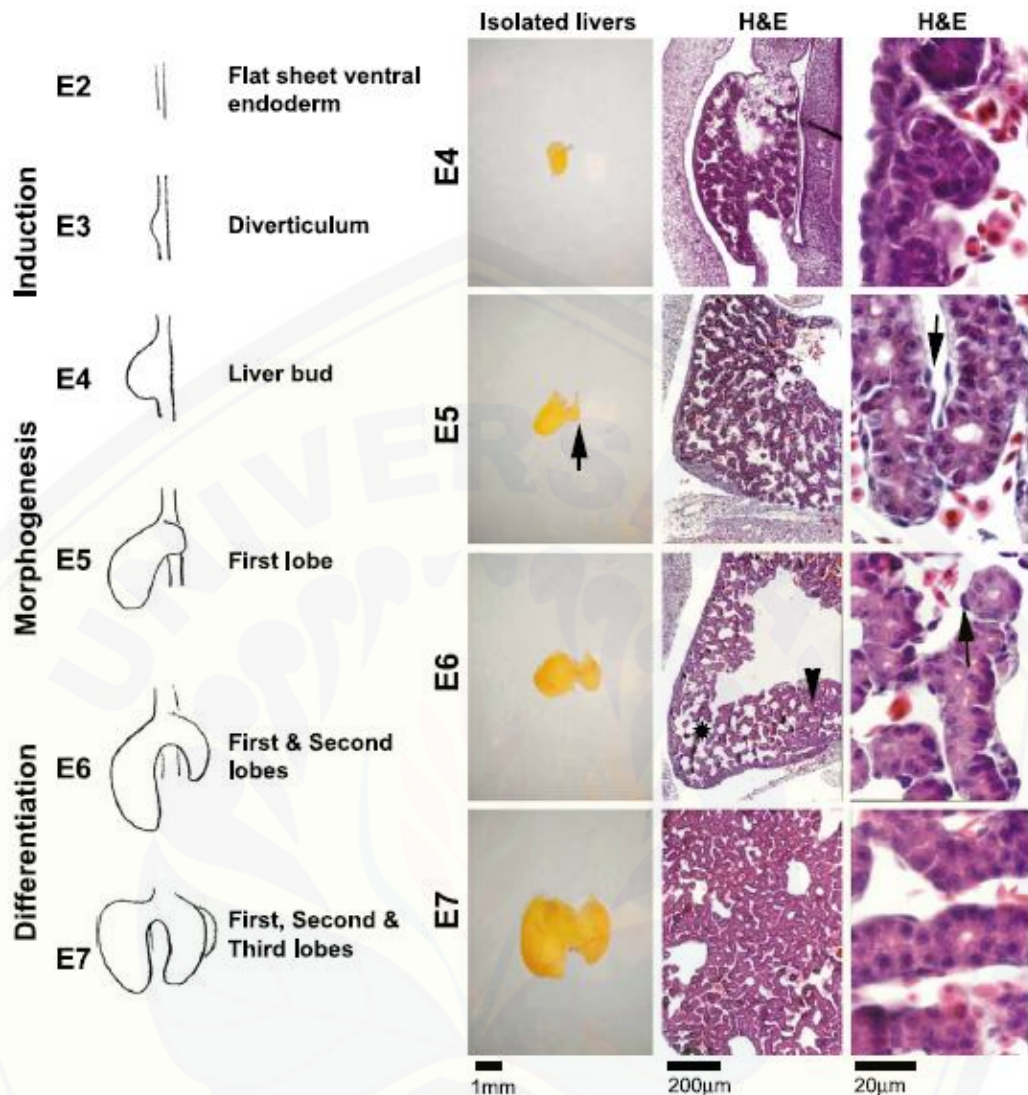
Spesies : *Gallus gallus*

Subspesies : *G. g. domesticus*

2.2.2 Perkembangan Hati Embrio Ayam

Hati embrio ayam mulai terbentuk dari hari kedua atau ketiga dan diinduksi oleh faktor pertumbuhan yang diproduksi oleh mesoderm yaitu *fibroblast growth factor* 1 (FGF1), FGF 2 dan FGF 8 (Suksaweang *et al*, 2004). Hati embrio ayam dibentuk dari mesoderm splankhnik dari mesenterika ventral dengan endoderm yang membentuk divertikula usus di regio kardiohepatik. Divertikula primer endoderm tersebut akan terbagi menjadi dua divertikulum sekunder yaitu anterior dan posterior. Pembagian tersebut disebabkan penggabungan divertikula primer dengan mesoderm (Bellairs dan Osmond, 2014).

Mesoderm tersebut kemudian menjadi septum transversum dan endoderm yang menjadi prekursor hepatosit (hepatoblas) membentuk korda hepatic. Selain hepatosit, sel kupfer dan sel hemopoietik juga berasal dari diferensiasi endoderm. Pada akhir hari kedua, korda mulai dipenuhi hepatoblas yang tersusun tidak teratur. Pada hari kelima, bersamaan dengan pembentukan lobus kedua, hati dilingkupi oleh sel endotel berbentuk spindel. Hal ini menyebabkan hepatosit yang awalnya tidak teratur membentuk asinus-asinus. Pada hari keenam hati mulai memproduksi sel darah. Pada hari ke tujuh hati membentuk lobus ketiga. Hingga fase ini sel hati masih berbentuk kuboid tinggi. Hati terus membesar dan semakin terisi oleh hepatosit. Hari kedelapan, mulai terlihat vesikel glikogen berada di sekitar badan golgi dan terdapat droplet lipid di sitoplasma. Hari kesembilan sel hati sudah berbentuk piramid. Hati juga telah membentuk sambungan dengan saluran empedu. Sambungan ini disebut sebagai sambungan apikolateral dan segera menyekresikan getah empedu. Dari hari kedelapan hingga hari ke -14 ukuran hati relatif konstan, hal ini terjadi karena fase pertumbuhan sel hati. hati mengalami peningkatan ukuran kembali hingga hari ke-20 sebagai fase peningkatan sintesis dan volume hati (Wong dan Cavey, 1992; Doaa *et al*, 2013).



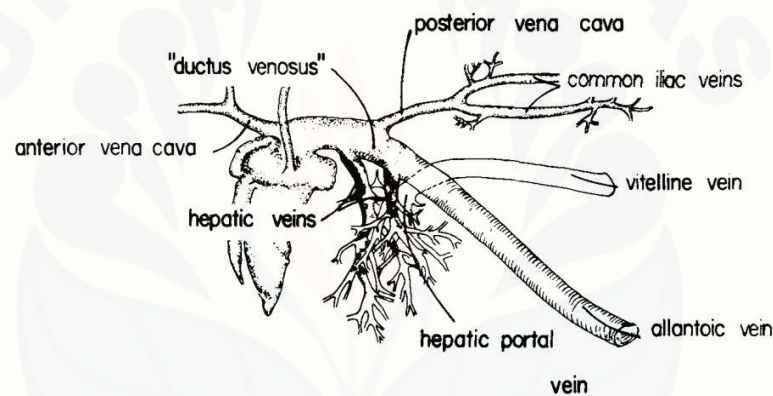
Gambar 2.1 Perkembangan hati embrio ayam (Suksaweang *et al*, 2004)

2.2.3 Induksi Alkohol pada Embrio Ayam

Induksi alkohol berupa etanol telah dilakukan pada embrio ayam. Dari pemberian 5%, 10% dan 15%, pemberian etanol 15% menyebabkan kematian embrio ayam mencapai 43.2%, sedangkan pemberian 5% dan 10% tidak didapatkan kematian embrio ayam (Chaudhuri, 2006). Pada penelitian lain paparan etanol pada jam ke 72 sebesar 1%, 3% tidak menyebabkan kerusakan signifikan pada pembuluh darah sedangkan pemberian etanol sebesar 10% menunjukkan adanya inhibisi pembentukan pembuluh darah, dan paparan etanol sebesar 13% dan 15% menunjukkan penghambatan pembentukan pembuluh darah

yang lebih berat dari pada etanol 10%. Pada studi lain pemberian etanol 5-10% menyebabkan terjadi malformasi pada kepala ayam (Laghari *et al*, 2015; Flentke dan smith, 2018).

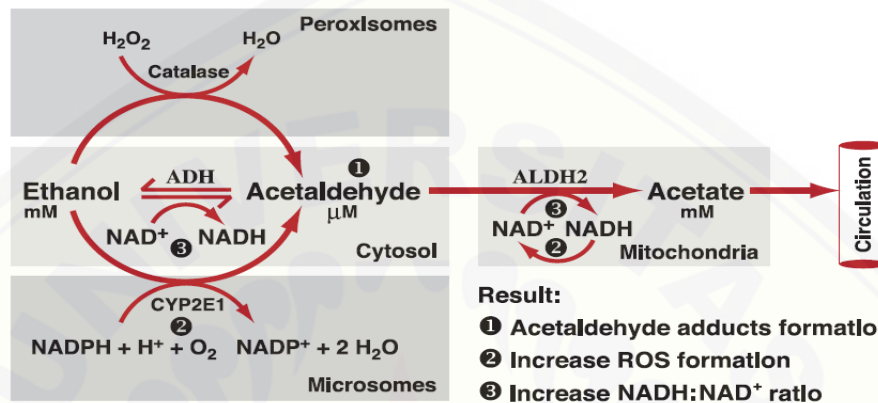
Terdapat banyak rute pemberian paparan pada embrio ayam, salah satunya melalui kantung udara telur. Alkohol yang dipaparkan melalui kantung udara telur akan diserap melalui pori-pori membran dalam embrio oleh pembuluh darah allantois embrio yang terbentuk sempurna pada usia 10 hari (Lihat gambar 2.2 dan 2.4). Alkohol akan diangkut oleh vena allantois menuju ke embrio. Pada embrio, vena allantois akan diteruskan menjadi vena cava. Kemudian alkohol dibawa ke jantung dan diedarkan keseluruh jaringan embrio (Brauer *et al*, 1963; Nowak-Sliwinska *et al*, 2014).



Gambar 2.2 Anatomi suplai darah embrio ayam (Brauer *et al*, 1963)

Pada berbagai organ alkohol dimetabolisme melalui dua jalur yaitu oksidatif, dan jalur nonoksidatif. Metabolisme alkohol dalam jalur oksidatif menggunakan enzim alkoholdehidrogenase (ADH), sitokrom P450 (CYP450), dan katalase. ADH memberikan peranan utama dalam metabolisme oksidatif alkohol, ADH hati embrio ayam dihasilkan mulai hari kesembilan. Sedangkan CYP450 dan katalase terjadi di daerah dengan aktivitas ADH yang rendah dan beberapa sel lain seperti otak. Alkohol akan diubah menjadi asetaldehida oleh ketiga enzim tersebut. Asetaldehida kemudian segera dioksidasi lagi oleh aldehyd dehidrogenase (ALDH) di sitoplasma dan mitokondria membentuk asetat. Asetat masuk ke aliran darah dan teroksidasi menjadi CO_2 di otot, jantung dan otak (Barnett *et al*, 2009; Kent, 2012). Alkohol juga dimetabolisme secara nonoksidatif

dalam jumlah yang sedikit. Terdapat dua jalur metabolisme alkohol secara nonoksidatif yaitu reaksi alkohol dengan asam lemak yang menghasilkan asam lemak etil ester dan menggunakan enzim fosfolipase D menghasilkan fosfatidil etanol yang menyebabkan penurunan asam fosfatidil yang berperan dalam persinyalan sel (Zakhari, 2006).

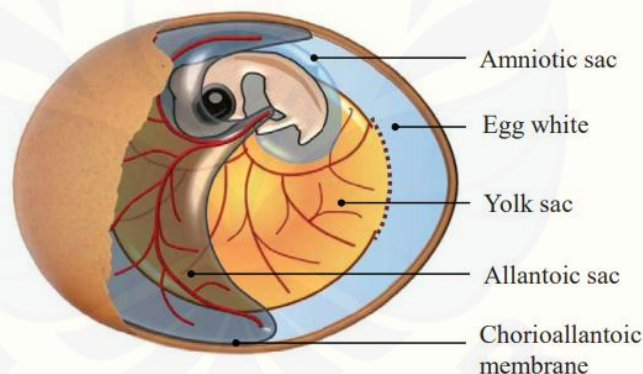


Gambar 2.3 Metabolisme alkohol di hati (Zakhari, 2006)

ROS merupakan molekul yang sifatnya reaktif karena mengandung elektron yang tidak berpasang. ROS akan berinteraksi dengan berbagai struktur dan molekul yang ada pada sel seperti DNA, protein dan lipid untuk mengambil atom hidrogen untuk dipasangkan dengan elektron bebasnya agar membentuk molekul stabil atau ROS akan bergabung dengan molekul stabil dan membentuk radikal bebas yang lain (Zakhari, 2006). Peroksidasi lipid merupakan efek mayor yang dihasilkan oleh ROS. Hal ini dapat menyebabkan kerusakan berbagai struktur sel terutama yang mengandung lipid seperti membran sel, retikulum endoplasma, dan mitokondria (Muriel, 2009). ROS juga akan menyebabkan aktivasi sel makrofag seperti sel kupfer yang kemudian akan menyebabkan inflamasi, selain itu aktivasi sel kupfer akan menyebabkan peningkatan penggunaan oksigen oleh sel kupfer, sehingga banyak sel hati akan mengalami hipoksia karena kekurangan oksigen kemudian akan mati (Zakhari, 2006). Kematian dan kerusakan sel ini akan menyebabkan peningkatan kadar enzim seperti AST dan ALT di ekstraseluler (McGill, 2016).

2.2.4 Cairan Amnion Embrio Ayam

Cairan amnion atau biasa disebut air ketuban merupakan cairan jernih yang ada disekitar embrio dibatasi oleh kantung amnion. Cairan amnion berfungsi sebagai pelindung janin dari trauma, melindungi dari infeksi, tempat penyimpanan nutrisi dan cairan embrio serta menjadi faktor pendukung yang penting untuk pertumbuhan dan perkembangan sistem pernafasan dan gastrointestinal (Ross *et al*, 2007). Amnion tidak mengandung vaskularisasi dan terbentuk dari awal masa embrio. Semua kandungan dalam cairan amnion berasal langsung dari jaringan embrio (Tong, 2013). Hal ini dijadikan dasar penggunaan cairan amnion sebagai indeks kesehatan embrio dan spesimen cairan untuk diagnosis klinis terutama untuk pengujian terhadap protein dan faktor pertumbuhan. Beberapa penelitian menggunakan cairan amnion embrio ayam pada penelitian untuk analisis biokimia seperti kadar AST dan ALT (Mastan *et al*, 2007; Hitesh, 2015).

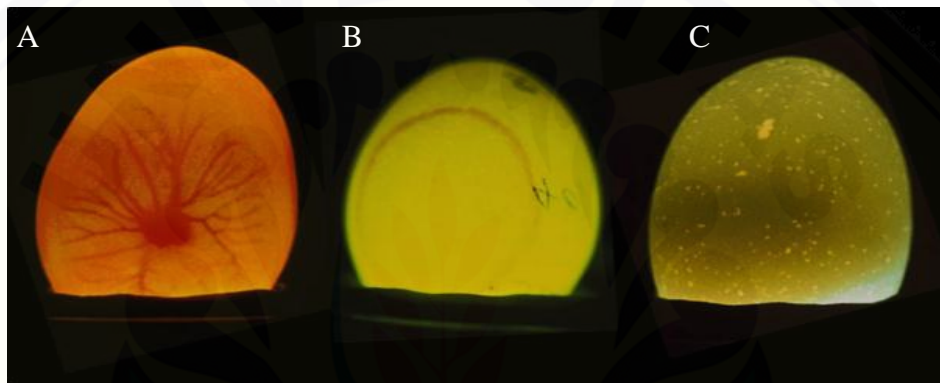


Gambar 2.4 Anatomi telur (Da Silva *et al*, 2018)

2.3 Candling

Candling merupakan suatu cara penilaian terhadap perkembangan embrio didalam telur ayam dan kemampuannya dalam menetas. Pada suatu peternakan perlu adanya proses *candling* untuk mengetahui adanya infertilitas telur karena rendahnya kualitas perkawinan induk ayam atau kematian telur pada awal perkembangan selama inkubasi. Kematian tersebut bisa disebabkan oleh kesalahan dari faktor pendukung inkubasi seperti kelembapan, suhu, dan

kontaminasi mikroorganisme. *Candling* juga dapat menunjukkan adanya keretakan pada kerabang telur yang tidak terlihat oleh mata. Pada telur ayam *candling* dilakukan setelah hari ke 5-7 inkubasi dengan cara melewatkan sinar pada suatu ruangan gelap. Hasil *candling* dapat berupa gambaran gelap dengan pembuluh darah, cincin pembuluh darah, dan terang tanpa terlihat pembuluh darah. Gambaran gelap dengan pembuluh darah menunjukkan adanya embrio yang berkembang dalam telur, gambaran cincin pembuluh darah menunjukkan adanya embrio yang mati pada awal perkembangan, dan gambaran terang tanpa pembuluh darah menunjukkan infertilitas telur (Widodo, 1999; Ernst *et al*, 2004).



(A) Gambaran gelap dengan pembuluh darah; (B) Gambaran cincin pembuluh darah; (C) Gambaran terang tanpa pembuluh darah.

Gambar 2.5 Hasil *candling* (Ernst *et al*, 2004)

2.4 Kelor

2.4.1 Klasifikasi dan Morfologi Tanaman Kelor

Menurut *Integrated Taxonomic Information System* (ITIS), klasifikasi tanaman kelor yaitu sebagai berikut

Kingdom: Plantae

Divisi : Tracheophyta

Kelas : Magnoliopsida

Famili : Moringaceae

Genus : Moringa

Spesies: *Moringa oleifera* Lamk.

Tanaman kelor merupakan tanaman tropis dan subtropis yang berasal dari daerah di sebelah barat laut kaki Pegunungan Himalaya. Kelor memiliki banyak nama di dunia, begitupun di Indonesia ada berbagai macam nama kelor, dalam bahasa Jawa, Sunda, Bali, Lampung disebut kelor. Dalam bahasa Madura marongih, Flores disebut moltong, Bahasa Bugis disebut kelo, Bahasa Bima disebut ongge, dalam Bahasa Sumatra disebut murong atau barungai, dan dalam Bahasa Timor disebut hau fo (Aminah, *et al* 2015).

Kelor berbentuk perdu dan digolongkan sebagai komoditas hutan bukan kayu. Tanaman kelor mampu mencapai tinggi 7-11 meter pada dataran rendah. Kelor merupakan kayu berjenis lunak, dan kualitasnya rendah sehingga tidak dapat digunakan untuk bangunan. Berakar lunak, dan berwarna kuning pucat, kulit akarnya beraroma tajam dan pedas. Kelor berberdaun majemuk, tulang daunnya menyirip tidak sempurna sehingga berbentuk seperti bundar telur, berwarna hijau sampai hijau kecokelatan, panjang 1-3 cm, lebar 4 mm sampai 1 cm, ujung daun tumpul, pangkal daun membulat, tepi daun rata (Isnan dan Muin, 2017).



Gambar 2.6 Tanaman kelor (<https://wikipedia.org>)

Warna bunganya bervariasi dari merah, putih, dan putih kekuning-kuningan tergantung jenisnya dengan tudung pelepah bunganya berwarna hijau. Di Indonesia lebih banyak yang berwarna putih kekuningan. Buahnya memanjang

dapat mencapai 20-60 cm, dengan warna buah hijau saat muda dan coklat saat tua. Dalam buah terdapat biji yang berbentuk bundar berwarna hijau saat muda dan coklat kehitaman saat matang dan mengering. Seratus biji kelor beratnya mencapai 18-36 gram (Isnain dan Muin, 2017).

2.4.2 Kandungan Tanaman Kelor

Kelor sudah dikenal dari zaman dahulu, dengan berbagai macam manfaat. Kelor mendapat julukan *mother best friend*, *miracle tree*, dan *tree of life* karena kandungan dari semua bagiannya. Daun kelor seberat 100 gram memiliki kandungan kalsium setara dengan segelas susu, zat besi setara dengan 200 gram daging sapi, dan protein sama dengan sebutir telur (Amzu, 2015). Kandungan pada kelor lebih rinci disajikan dalam tabel 2.1 dan 2.2.

Dalam bidang pengobatan tradisional kelor dipakai sebagai antiinflamasi. Suatu studi menunjukkan potensi antiinflamasi ekstrak daun kelor terhadap inflamasi yang diinduksi oleh karagenan pada mencit albino (Mittal *et al*, 2017). Ekstrak kelor juga dilaporkan memiliki aktivitas sebagai kanal calcium blocker, sehingga memiliki potensi sebagai antihipertensi (Dangi *et al*, 2002). Ekstrak daun dan biji kelor juga dilaporkan memiliki efek antifungi melawan dermatofita seperti *Microsporium canis* (Chuang *et al*, 2007).

Tabel 2.1 Kandungan Kelor

Nutrisi	Bunga	Buah	Biji
Kalori (Kkal/100g)	6.2	50.73	15.96
Kadar air (%)	93.02	90.86	3.11
Protein (g)	24.5	12.36	32.19
Lemak(g)	6.01	0.98	32.40
Serat(g)	5.07	22.57	15.87
Mineral(g)	58.08	13.40	5.58

Sumber : Amina *et al*. (2015)

Tabel 2.2 Kandungan Daun Kelor

Nutrisi	Daun segar	Daun kering
Kalori (Kal)	92	329
Protein (g)	6.7	29.4
Lemak (g)	1.7	5.2
Karbohidrat (g)	12.5	41.2
Serat (g)	0.9	12.5
Kalsium (mg)	440	2185
Magnesium (mg)	42	448
Fosfor (mg)	70	225
Kalium (mg)	259	1236
Tembaga (mg)	0.07	0.49
Besi (mg)	0.85	25.6
Vitamin B1(mg)	0.06	2.02
Vitamin B2 (mg)	0.05	21.3
Vitamin B3 (mg)	0.8	7.6
Vitamin C (mg)	220	15.8
Vitamin E (mg)	448	10.8
Myrectin (mg)		5.8
Quercetin (mg)		0.207
Kaempferol (mg)		7.57
Gallic acid (mg)		1.034
Chlorogenic acid (mg)		0.018-0.489
Caffeic acid (mg)		0.409
Alkaloid		
Tannin (g/kg)		13.2-20.6
Saponin (g/kg)		64-81

Isnan dan Muin (2017); Vergara-Jimenez *et al.* (2017)

2.4.3 Fitokimia Daun Kelor

Quercetin (3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavone) merupakan flavonoid golongan flavonol yang berbentuk aglikon. Quercetin berwarna kuning, mudah larut dalam alkohol dan lemak. Quercetin tidak diproduksi dalam tubuh dan banyak terkandung dalam buah, sayur, teh, coklat dan anggur merah (Wu *et al*, 2017). Quercetin melawan toksisitas etanol merupakan gabungan efek antioksidan dan antiinflamasi quercetin. Quercetin meningkatkan aktifitas antioksidan di hati seperti menginduksi dan meningkatkan heme oksigenase-1 yang merupakan enzim antioksidan sehingga menurunkan stres oksidatif sel, meningkatkan penangkapan radikal bebas, dan menurunkan peroksidasi lipid. Aktivitas quercetin juga menurunkan sitokin inflamasi (Miltonprabu *et al*, 2017; Vidhya dan Indira, 2009). Quercetin juga memiliki efek antiproliferasi terhadap sel kanker melalui stabilisasi gen P53, menghambat jalur PI3K-Akt/PKB, dan memodulasi ekspresi gen Ras-p21 sehingga menginduksi apoptosis dan cek poin sel (Liu *et al*, 2010). Sebagai antioksidan quercetin bertindak sebagai donor elektron pada oksidan (Zheng *et al*, 2017).

Kaemferol (3,4,5,7-tetrahydroxyflavone) merupakan golongan flavonoid yang larut dalam alkohol panas, eter, zat-zat yang bersifat alkali, golongan benzena dan air. Banyak terdistribusi pada tumbuhan untuk pengobatan tradisional, sayur dan buah. Kaemferol dapat menghambat CYP450 yang mengkatalisis metabolisme alkohol sehingga menghambat kerusakan jaringan hati. kaemferol juga dapat melindungi hati dari jejas akibat isoniazid dan rifampicin. Kaemferol memiliki cicin fenolik dan hidroksil yang cenderung menjadi donor elektron atau hidrogen pada radikal bebas (Wang *et al*, 2015; Shih *et al*, 2015; *National Center for Biotechnology Information*, 2019).

Asam galat (3,4,5-trihydroxybenzoicacid) merupakan senyawa fenol yang larut dalam lemak. Asam galat dapat meningkatkan aktifitas CYP450-dependen monooksigenase dan meningkatkan hidrolasi epoksida. Pada kerusakan yang induksi parasetamol asam galat dapat menurunkan mediator inflamasi TNF α (Rasool *et al*, 2010).

Riboflavin (vitamin B2) merupakan vitamin yang larut dalam air. Riboflavin memiliki aktivitas hepatoprotektif terhadap ROS dengan bertindak sebagai antioksidan. Riboflavin dapat meregenerasi penyimpanan glutathione (GSH) yang merupakan antioksidan endogen dihati. Riboflavin juga memiliki efek antiinflamasi dengan menurunkan regulasi TNF α , IL-6 dan NO (Sanches *et al*, 2014).

Vitamin E merupakan vitamin larut lemak. Vitamin E dapat menurunkan tingkat peroksidasi lipid dan cenderung mendonorkan atom hidrogen pada radikal bebas sehingga dapat memutus rantai radikal bebas. Bahkan vitamin E dapat memperbaiki kerusakan hati yang disebabkan oleh heksaklorobenzena (Chalouati *et al*, 2018).

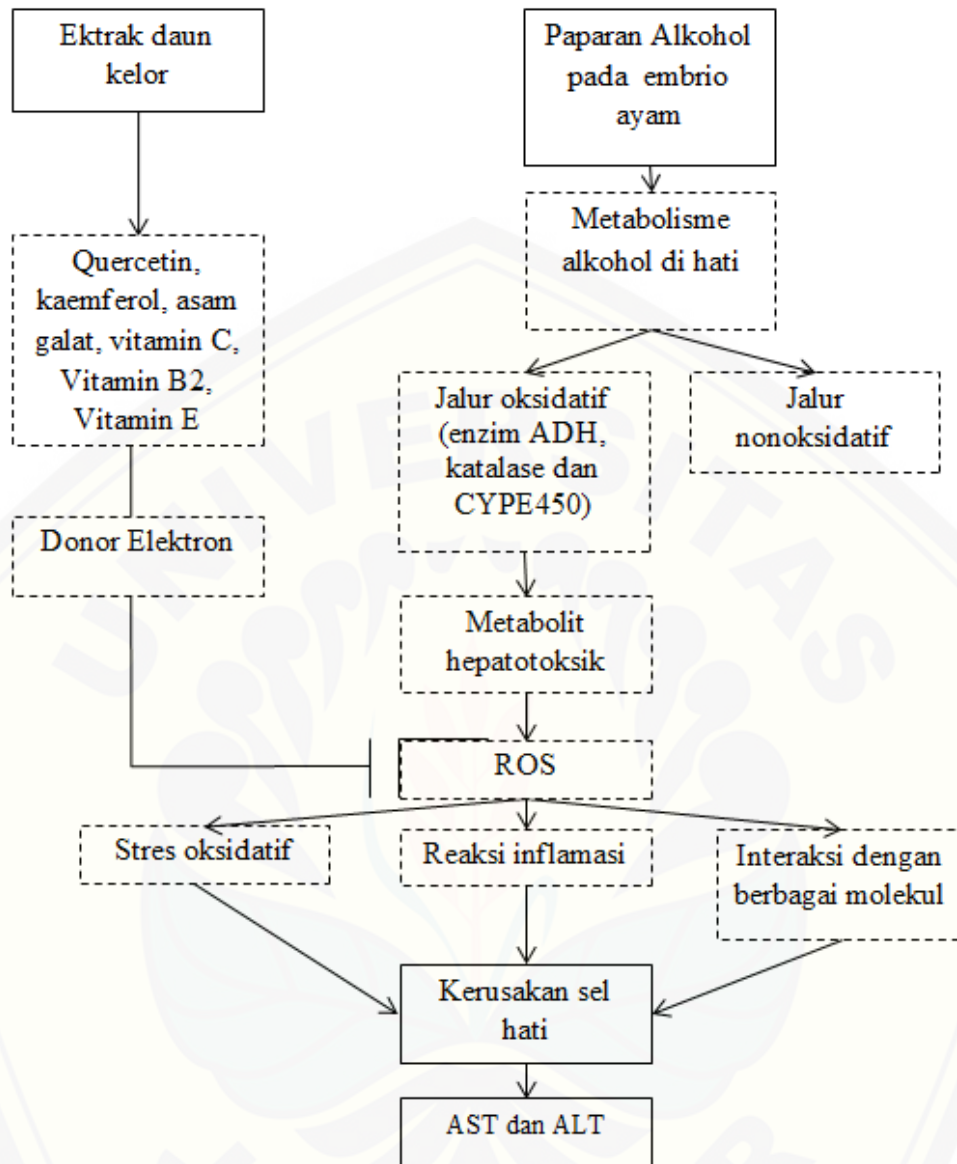
Asam askorbat (vitamin C) merupakan vitamin yang larut air. Asam askorbat memiliki enam gugus karbon. Asam askorbat memiliki efek hepatoprotektif dengan meningkatkan GSH, dan menjaga integritas sel hati melawan berbagai zat yang bersifat hepatotoksik seperti cypermethrin. Efek hepatoprotektor asam askorbat bersifat sinergis dengan vitamin E melawan etanol, organofosfat, dan zat-zat lain yang bersifat hepatotoksik (Adikwu dan Deo, 2013).

2.6 Ekstraksi

Ekstrak merupakan sediaan kental yang diperoleh dari ekstraksi senyawa aktif simplisia nabati atau hewani. Ekstraksi merupakan proses pemisahan bahan dari campurannya dengan pelarut yang sesuai (Hariyati, 2005). Terdapat banyak metode dalam ekstraksi salah satunya yang banyak digunakan adalah teknik maserasi. Metode ini dilakukan dengan memasukkan serbuk tanaman dan pelarut dalam sebuah wadah tertutup pada suhu kamar. teknik ini menyebabkan kerusakan pada dinding sel kemudian bahan zat yang akan diambil akan terlarut oleh pelarut. Kekurangan metode ini adalah menggunakan pelarut yang cukup banyak sedangkan keuntungannya menghindari kerusakan senyawa-senyawa yang bersifat termolabil (Azwanida 2015; Susanty dan Bachmid, 2016).

2.7 Kerangka Konseptual

Alkohol yang dipaparkan pada embrio ayam akan menyebabkan metabolisme oksidatif dan non oksidatif alkohol pada embrio ayam. Metabolisme alkohol dalam jalur oksidatif menggunakan enzim alkoholdehidrogenase ADH, CYP450, dan katalase. Pada jalur ini alkohol diubah menjadi asetaldehid kemudian menjadi asetat. Kemudian asetat akan keluar melalui darah. Selama metabolisme ini akan terbentuk ROS yang dapat menyebabkan kerusakan sel dengan meningkatkan stress oksidatif, mengaktifasi makrofag dan menyebabkan inflamasi serta berinteraksi dengan berbagai molekul. Kerusakan sel yang terjadi akan menyebabkan rilis enzim-enzim seperti AST dan ALT pada hati. Ekstrak daun kelor yang mengandung berbagai zat yang memiliki efek hepatoprotektif seperti quercetin, kaempferol, asam galat, vitamin B2, vitamin E, dan vitamin C. Efek hepatoprotektif ekstrak daun kelor diharapkan mampu menghambat ROS dengan bertindak sebagai donor elektron yang dihasilkan dari proses metabolisme alkohol jalur oksidatif di hati embrio ayam. Penghambatan ini akan menyebabkan pemutusan rantai radikal bebas, penurunan jumlah ROS sehingga tidak terjadi stress oksidatif dan mencegah terjadi reaksi inflamasi. Kedua hal ini akan mencegah atau menghambat kerusakan sel hati yang disebabkan oleh metabolisme alkohol di hati embrio ayam yang ditandai dengan perubahan kadar AST dan ALT.



Gambar 2.7 Kerangka konseptual

Keterangan :

- : diteliti
- : tidak diteliti
- : merangsang
- ⊥ : menghambat

2.8 Hipotesis

Hipotesis dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak daun kelor berpengaruh terhadap kadar AST dan ALT embrio ayam yang diinduksi alkohol.



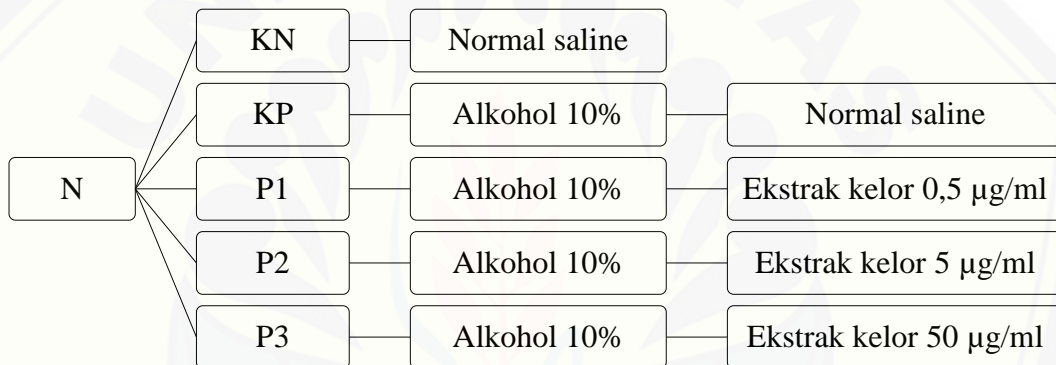
BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang akan digunakan dalam penelitian ini yaitu *true experimental design*.

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *posttest only control group design*. Dengan skema sebagai berikut



Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian

Keterangan

N: Sampel

KN: kelompok kontrol negatif

KP: kelompok kontrol positif

P1: kelompok perlakuan 1

P2: kelompok perlakuan 2

P3: kelompok perlakuan 3.

3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Waktu pelaksanaan penelitian yaitu bulan Desember 2018 - Januari 2019.

3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

3.4.1 Populasi Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh telur ayam jawa super yang dihasilkan hari yang sama yang diperoleh dari Unit Pelaksana Teknis (UPT) Peternakan Politeknik Negeri Jember.

3.4.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah telur ayam berembrio berusia tujuh hari. Pengelompokan sampel dilakukan secara *simple random sampling*.

3.4.3 Jumlah Sampel

Jumlah sampel yang dibutuhkan menurut rumus *Federer* adalah

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

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

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

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

$$r \geq 4,75$$

Dengan

t: jumlah kelompok

r: jumlah sampel

Berdasarkan hasil perhitungan diatas, jumlah sampel minimal tiap kelompok adalah 5 sehingga total sample yang digunakan sebanyak 25 butir telur.

3.4.4 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

a. Kriteria Inklusi

1. Telur ayam varietas ayam jawa super yang berusia tujuh hari.
2. *Candling* hari ketujuh menunjukkan gambaran gelap dan bayangan pembuluh darah
3. Telur memiliki berat 0,45 gram-0,55 gram.

b. Kriteria Eksklusi

1. Kerabang rusak
2. Embrio tidak tumbuh pada hari ketujuh dengan hasil *candling* telur terlihat gambaran terang atau cincin pembuluh darah.

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 kadar AST dan ALT embrio ayam usia 15 hari.

3.5.3 Variabel Terkendali

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

3.6 Definisi Operasional

Tabel 3.1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi operasional	Satuan	Skala
Ekstrak daun kelor	Daun kelor didapatkan dari kawasan Perhutani Kecamatan Rambipuji. Daun yang diambil daun yang berwarna hijau tua. Ekstraksi dilakukan menggunakan teknik maserasi dengan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1 kg bubuk daun kelor dimaserasi dengan 4 L etanol selama 24 jam. Ekstrak diberikan satu kali dengan dosis 50 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ dan 0,5 $\mu\text{g/ml}$ sebanyak 250 ml melalui kantung udara telur.	$\mu\text{g/ml}$	Rasio
Kadar AST dan ALT	Pengukuran AST dan ALT dilakukan menggunakan metode kinetik enzimatik IFCC dengan cairan amnion sebagai sample.	U/L	Rasio
Embrio ayam	Embrio ayam merupakan varietas ayam jawa super yang didapatkan dari UPT Peternakan Politeknik Negeri Jember dengan hasil <i>candling</i> telur pada hari ketujuh menunjukkan ada bagian berwarna gelap, dan terlihat bayangan pembuluh darah.	Butir	Nominal
Induksi alkohol	Induksi alkohol menggunakan etanol 10% sebanyak 100 μl . Induksi dilakukan dengan menginjeksikan melalui kantung udara telur.	ml	Rasio

3.7 Alat dan Bahan

3.7.1 Alat

Penelitian ini menggunakan alat-alat berupa inkubator untuk tempat inkubasi telur ayam, lemari pendingin untuk menyimpan ekstrak dan reagen, spuit untuk mengambil cairan amnion dan injeksi perlakuan, plester bening untuk menutup lubang yang dibuat, *waterbath* untuk menguapkan pelarut pada pembuatan ekstrak daun kelor, senter untuk *candling* telur, *automatic biochemistry analyzer* untuk mengukur kadar AST dan ALT, *minidrill* untuk melubangi telur, kertas saring, vortex, magnetic stirrer, *disposable tube*, cawan petri, sentrifus, gunting, botol kaca, corong, ayakan, spidol, blender, gelas kimia, gelas ukur, mikropipet, mikrotip, gunting, pinset, tabung reaksi, dan timbangan.

3.7.2 Bahan

Penelitian ini menggunakan bahan-bahan berupa telur ayam fertil, akuades steril, ekstrak daun kelor, etanol, normal saline, serta reagen pemeriksaan AST dan ALT.

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Pembuatan Ekstrak Daun Kelor

Pembuatan ekstrak daun kelor dilakukan berdasarkan dengan sedikit modifikasi penelitian sebelumnya menggunakan teknik maserasi dengan pelarut etanol 96% (Indahsari *et al*, 2016). Daun kelor dicuci bersih dengan air, kemudian diangin-anginkan tanpa terkena sinar matahari langsung hingga kering. Daun kelor yang sudah kering di blender. Bubuk daun kelor diayak untuk memisahkan bagian daun yang masih kasar. Bubuk halus daun kelor kemudian dimaserasi dengan perbandingan satu kilogram bubuk daun kelor dalam etanol 96% sebanyak empat liter kemudian didiamkan selama 24 jam. Hasil maserasi di saring menggunakan kertas penyaring. Kemudian filtrat dievaporasi menggunakan *waterbath* pada suhu 60°C hingga membentuk sediaan kental (Lampiran 3.1).

3.8.2 Pengenceran Ekstrak Etanol Daun Kelor

Dosis ekstrak daun kelor yang digunakan dalam penelitian ini mengacu pada penelitian oleh N'nanle *et al.* (2017). Untuk membentuk dosis 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (larutan A), 20 ml normal saline ditambah dengan 10 mg ekstrak daun kelor kemudian dihomogenisasi. Untuk membentuk dosis 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (larutan B), larutan A diambil sebanyak 1 ml kemudian ditambah normal saline 9 ml dalam tabung reaksi lalu dihomogenisasi. Untuk menghasilkan dosis 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (larutan C), larutan B diambil sebanyak 1 ml kemudian ditambah normal saline sebanyak 9 ml dalam tabung reaksi lalu dihomogenisasi. Untuk menghasilkan dosis 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, larutan C diambil sebanyak 1 ml kemudian ditambah normal saline sebanyak 9 ml dalam tabung reaksi lalu dihomogenisasi (Lampiran 3.2).

3.8.3 Tahap Perlakuan terhadap Telur Ayam

Telur usia satu hari dicuci dengan akuades dan dilap dengan alkohol 70%. Telur diinkubasi hingga hari ketujuh pada temperatur 37.5°C dan kelembapan 70-80%. Pada hari ketujuh dilakukan *candling* telur untuk seleksi sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi. Kemudian telur yang sesuai dengan kriteria eksklusi dan inklusi dirandomisasi dan dikelompokkan sesuai dengan hasil randomisasi. Telur diinkubasi kembali hingga hari ke-12.

Pada hari ke-12 Setiap telur dilubangi sebanyak dua lubang menggunakan *minidrill* di atas kantung udara telur dengan jarak antar lubang $\pm 0,5$ cm. Lubang digunakan untuk tempat injeksi. Pada hari ke-12, setiap telur pada kelompok KP, P1, P2, dan P3 diinjeksi 250 μl etanol 10% kedalam kantung udara telur sedangkan telur pada kelompok KN diinjeksi normal saline sebanyak 250 μl . Lubang tempat injeksi pada telur ditutup dengan plester. Telur diinkubasi kembali selama 24 jam. Setelah 24 jam, telur diinjeksi masing-masing 100 μl perlakuan sesuai dengan kelompok masing-masing pada lubang yang sama, normal saline untuk KP, ekstrak daun kelor 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ untuk kelompok P1, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ untuk kelompok P2, dan 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ untuk kelompok P3. Tempat injeksi ditutup dengan plester kembali dan telur diinkubasi hingga hari ke-15 (Lampiran 3.3).

3.8.4 Tahap Pengambilan Cairan Amnion Sampel

Telur berusia 15 hari dipecahkan dengan hati-hati dari bagian yang tempat kantung udara telur dan diletakkan pada cawan petri dengan hati-hati tanpa merusak telur. Letak cairan amnion diidentifikasi lalu cairan amnion diserap menggunakan spuit sebanyak 1 ml. Cairan amnion disentrifus pada 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil untuk diukur kadar AST dan ALT (Lampiran 3.4).

3.8.5 Tahap Pengukuran Kadar AST dan ALT Sampel

a. Pemeriksaan AST

Sebelum melakukan pengukuran kadar AST, reagen 1 AST yang terdiri dari TRIS, L-aspartat, dan MDH dicampur dengan reagen 2 AST yang terdiri dari 2-oxoglutarat dan NADH dengan perbandingan reagen 1 dengan reagen 2 yaitu 4:1. Kemudian reagen dikalibrasi menggunakan serum manusia. 100 μ l serum di masukkan kedalam 1000 μ l campuran reagen 1 dan 2 AST dalam tabung reaksi kemudian dihomogenkan. Lalu diukur kadar AST menggunakan *automatic biochemistry analyzer*, apabila sesuai dengan rentang kadar AST normal manusia maka reagen dan alat bisa digunakan.

Pengukuran kadar AST sampel dilakukan dengan mencampur 100 μ l supernatan dan 1000 μ l campuran reagen 1 dan 2 AST kedalam tabung tabung reaksi. Cairan dalam tabung dihomogenkan. Kadar AST diukur dengan menggunakan *automatic biochemistry analyzer* dengan panjang gelombang 340 nm (Lampiran 3.4).

b. Pemeriksaan ALT

Sebelum melakukan pemeriksaan ALT, reagen 1 ALT yang terdiri dari TRIS, L-alanin, dan LDH dicampur dengan reagen 2 ALT yang terdiri dari 2-oxoglutarat dan NADH dengan perbandingan reagen 1 dengan reagen 2 yaitu 4:1. Kemudian reagen dikalibrasi menggunakan serum manusia. 100 μ l serum di masukkan kedalam 1000 μ l campuran reagen 1 dan 2 ALT dalam tabung reaksi kemudian dihomogenkan dan diinkubasi satu menit. Lalu diukur kadar ALT

menggunakan *automatic biochemistry analyzer*, apabila sesuai dengan rentang kadar ALT normal manusia maka reagen dan alat bisa digunakan.

Pengukuran kadar ALT sampel dilakukan dengan mencampur 100 μ l supernatan dan 1000 μ l campuran reagen1 dan 2 ALT kedalam tabung tabung reaksi. Cairan dalam tabung dihomogenkan. Kadar ALT diukur dengan menggunakan *automatic biochemistry analyzer* dengan panjang gelombang 340nm (Lampiran 3.4).

3.9 Analisis Data

Data yang di ambil adalah kadar AST dan ALT amnion embrio ayam. Normalitas distribusi data diuji dengan *Saphiro wilk* dan homogenitas data diuji dengan *Levene*. Apabila data normal dan homogen maka analisis data yang digunakan adalah *Oneway ANOVA* ($p>0.05$). Kemudian untuk melihat rata-rata antar dua kelompok uji statistik dilanjutkan dengan *Post hoc LSD*.

5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak daun kelor berpengaruh terhadap kadar AST dan ALT embrio ayam yang diinduksi alkohol.

5.2 Saran

Dari hasil penelitian yang diperoleh, masih perlu dilakukan pengkajian dan pengembangan lebih lanjut mengenai :

- a. Kemampuan ekstrak daun kelor dalam menurunkan kadar AST dan ALT pada hewan coba yang lebih tinggi seperti mencit;
- b. Fraksi ekstrak daun kelor yang mampu menurunkan kadar AST dan ALT;
- c. Dosis efektif ekstrak daun kelor dalam menurunkan kadar AST dan ALT embrio ayam; dan
- d. Perubahan yang terjadi pada parameter lain atau secara histopatologi pada organ embrio ayam yang diinduksi alkohol dan pemberian ekstrak daun kelor.

DAFTAR PUSTAKA

- Adikwu, E. dan Deo, O. 2013. Hepatoprotective effect of vitamin C (ascorbic acid). *Pharmacology & Pharmacy*. 4(01): 84.
- Aminah, S., Ramdhan, T., dan Yanis, M. 2015. Kandungan nutrisi dan sifat fungsional tanaman kelor (*Moringa oleifera*). *Buletin Pertanian Perkotaan*. 5: 35-44.
- Amzu, E. 2015. Kampung Konservasi Kelor: Upaya Mendukung Gerakan Nasional Sadar Gizi dan Mengatasi Malnutrisi di Indonesia. *Risalah Kebijakan Pertanian dan Lingkungan: Rumusan Kajian Strategis Bidang Pertanian dan Lingkungan*. 1: 86-91.
- Araghi, A., Hoseini, S. M., Sayrafi, R., dan Sadighara, P. 2016. Involvement of Oxidative Stress in the Sulfadiazine Hepatotoxicity in Chicken Embryo Model. *Journal of Food Safety and Hygiene*. 2: 42-46.
- Azwanida, N. N. 2015. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medical Aromatic Plants*. 4(3): 3-8.
- Barnett, R. K., Booms, S. L., Gura, T., Gushrowski, M., dan Miller Jr, R. R. 2009. Exogenous folate ameliorates ethanol-induced brain hyperhomocysteinemia and exogenous ethanol reduces taurine levels in chick embryos. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 150(1):107-112.
- Bellairs, R. Dan Osmond, M. 2014. *Atlas of Chick Development*. Elsevier.
- Bjørnstad, S., Austdal, L. P. E., Roald, B., Glover, J. C., dan Paulsen, R. E. 2015. Cracking the Egg: Potential of the Developing Chicken as a Model System for Nonclinical Safety Studies of Pharmaceuticals. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 355(3): 386-396.
- Brauer, R. W., Julian, L. M., dan Krebs, J. S. 1963. Maturation of liver function in the chick embryo as explored with s35-sulfobromophthalein-vascular factors, biliary secretion, and conjugation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 111(1): 136-156.
- Chalouati, H., Ben Sâad, M. M., dan Payrastre, L. 2018. Hepatoprotective effects of vitamin E against hexachlorobenzene-induced hepatotoxicity and

oxidative stress in rats: histological, biochemical and antioxidant status changes. *Toxicology mechanisms and methods*. 1-8.

Chaudhuri, J. D. 2006. Effect of a Single Dose of Ethanol on Developing Peripheral Nerve of Chick Embryos. *European Journal of Anatomy*. 10(2): 53-60.

Chuang, P. H., Lee, C. W., Chou, J. Y., Murugan, M., Shieh, B. J., dan Chen, H. M. 2007. Anti-Fungal Activity of Crude Extracts and Essential Oil of *Moringa oleifera* Lam. *Bioresource technology*. 98(1): 232-236.

Crespo, P. dan Casar, B. 2016. The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane as an *in vivo* Model to Study Metastasis. *Bio-protocol*. 6: 1962.

Conigrave, K. M., Davies, P., Haber, P., dan Whitfield, J. B. 2003. Traditional Markers of Excessive Alcohol Use. *Addiction*. 96: 31-43.

Dangi, S. Y., Jolly, C. I., dan Narayanan, S. 2002. Antihypertensive Activity of the Total Alkaloids from the Leaves of *Moringa oleifera*. *Pharmaceutical biology*. 40(2): 144-148.

Das, M., Basu, S., Banerjee, B., Sen, A., Jana, K., dan Datta, G. 2018. Hepatoprotective Effects of Green *Capsicum Annum* Against Ethanol Induced Oxidative Stress, Inflammation and Apoptosis in Rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 227: 69-81.

Da Silva, M., Dombre, C., Brionne, A., Monget P., Chesse, M., De Pauw, M., Mills, M., Combes-Soia, L., Labas, V., Guyot, N., Nys, Y., dan Rehault-Godbert, S. 2018. Proteomic Specificities of the Chicken Amniotic Fluid: The Unique Features of Proteins Depicting the Chicken Amniotic Fluid.

David A. V., Arulmoli, R., dan Parasuraman, S. 2016. *Overviews of Biological Importance of Quercetin: a Bioactive Flavonoid*. http://www.phcogrev.com/text.asp?_2016/10/20/84/194044 [5 Oktober 2018]

Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2008. Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) 2007. *Jakarta: Departemen Kesehatan*.

Doaa, M. M., Enas, A., Hassan, A. H. S., dan Fatma, A. 2013. Dynamics of Liver Development in Dandarawi Chicken. *Journal of World's Poultry Research*. 3: 73-79.

- El-bakry, K., Toson, E. S., Serag, M., dan Aboaser, M. 2016. Hepatoprotective Effect of *Moringa oleifera* Leaves Extract Against Carbon Tetrachloride-Induced Liver Damage in Rats. *World journal of pharmaceutical research*. 5: 76-89.
- Engelking, L. R. 2011. *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry*, Edisi Kedua. Burlington: Academic Press.
- Ernst, R. A., Bradley, F. A., Abbott, U. K., dan Craig, R. M. 2004. Egg Candling and Breakout Analysis. *ANR Publication 8134*. California: ANR publication.
- Flentke, G. R. dan Smith, S. M. 2018. The Avian Embryo as a Model for Fetal Alcohol Spectrum Disorders. *Biochem Cell Bio*. 96(2): 98–106
- 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 & Agriculture Research (IJOEAR)*. 2: 151-161
- Hariyati, S. 2005. Standardisasi Ekstrak Tumbuhan Obat Indonesia. *Salah Satu Tahapan Penting dalam Pengembangan Obat Asli Indonesia, Info POM*. 6(4): 1-5.
- Hendri, A. H. Y. dan Setyawati, T. R. 2017. Tingkat Kerusakan Hepatosit Mencit yang Diinduksi Alkohol 40%. *Protobiont*. 6(1): 15-19.
- Herzfeld, A. dan Greengard, O. 1971. Aspartate aminotransferase in rat tissues: changes with growth and hormones. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 237(1): 88-98.
- Hitesh, U. S. 2015. Hepato-protective Effects of Herbal Drug on Adriamycin Induced Toxicity in Developing Chick Embryos. *American J. of Advanced Drug Delivery*. 3(3): 236-247.
- Indahsari, N. K., Masfufatun, dan Rianti, E. D. D. 2016. Potential Extract of *Moringa oleifera* as Hepatoprotective in White Rats (*Rattus novergicus*) Induced Toxic Doses of Paracetamol. *Jurnal Ilmiah Kedokteran Wijaya Kusuma*. 5(1): 58-66.
- Integrated Taxonomic Information System. 2018. *Moringa oleifera* Lamk. https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=503874&print_version=PRT&source=to_print#null [8 Oktober 2018].

- International Labour Organization .2013. *Kajian Ayam Buras dengan Pendekatan Rantai Nilai dan Iklim Usaha di Kabupaten Boven Digoel*. Boven Digoel: ILO
- Isnain, W. dan Muin, N. 2017 Ragam Manfaat Tanaman Kelor (*Moringa oleifera Lamk.*) bagi Masyarakat. *Info Teknis EBONI*. 14: 63-75
- Kent, W. 2012. The Pharmacokinetics of Alcohol in Healthy Adults. *Webmed Central PHARMACOLOGY*. 3(5).
- Khosravi, A., Sharifi, I., Tavakkoli, H., Derakhshanfar, A., Keyhani, A. R., Salari, Z., Mosallanejad, S. S., dan Bamorovat, M. 2018. Embryonic toxicopathological effects of meglumine antimoniate using a chick embryo model. *PloS one*. 13(5): p.e0196424.
- Kim, W. R., Flamm, S. L., Di Bisceglie, A. M., dan Bodenheimer, H. C. 2008. Serum Activity of Alanine Aminotransferase (ALT) as an Indicator of Health and Disease. *Hepatology*. 47(4): 1363-1370.
- Kurantowicz, N., Sawosz, E., Halik, G., Strojny, B., Hotowy, A., Grodzik, M., Piast, R., Pasanphan, W., dan Chwalibog, A. 2017. Toxicity Studies of Six Types of Carbon Nanoparticles in a Chicken-Embryo Model. *International journal of nanomedicine*. 12: 2887.
- Kwo, P. Y., Cohen, S. M., dan Lim, J. K. 2017. ACG Clinical Guideline: Evaluation of Abnormal Liver Chemistries. *The American journal of gastroenterology*. 112: 18-35.
- Laghari, Z. A., Samo, A. A., Waryani, B., Palh, Z. A., dan Hussain, K. 2015. Effects of a Single Dose of Ethanol on Survival Rate and Angiogenesis of Chick Embryo. *Animal and Veterinary Sciences*, 3(1): 8-11
- Liu, S., Hou, W., Yao, P., Zhang, B., Sun, S., Nüssler, A.K., dan Liu, L. 2010. Quercetin Protects Against Ethanol-Induced Oxidative Damage in Rat Primary Hepatocytes. *Toxicology in Vitro*. 24(2): 516-522.
- Mastan, M., Prasad, U. V., dan Parthasarathy, P. R. 2007. Protective Effect of *Bacopa monniera L.* on Cytarabine Induced Biochemical Changes in Chick Embryo. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. Vol. 22(1): 122.
- McGill, M. R. 2016. The Past and Present of Serum Aminotransferases and the Future of Liver Injury Biomarkers. *EXCLI journal*. 15: 817.
- Miltonprabu, S., Tomczyk, M., Skalicka-Woźniak, K., Rastrelli, L., Daglia, M., Nabavi, S. F., Alavian, S. M., dan Nabavi, S. M. 2017. Hepatoprotective

effect of quercetin: From chemistry to medicine. *Food and Chemical Toxicology*. 108: 365-374.

Mittal, A., Sharma, M., David, A., Vishwakarma, P., Saini, M., Goel, M., dan Saxena, K. K. 2017. An Experimental Study to Evaluate the Anti-Inflammatory Effect of *Moringa oleifera* Leaves in Animal Models. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology*. Vol. 6(2): 452-457.

Mokdad, A. A., Lopez, A. D., Shahrzad, S., Lozano, R., Mokdad, A. H., Stanaway, J., Murray, C. J., dan Naghavi, M. 2014. Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *BMC medicine*. 12(1): 145.

Morales-González, J. A., Sernas-Morales, M. L., Morales-González, Á., González-López, L. L., Madrigal-Santillán, E. O., Vargas-Mendoza, N., Fregoso-Aguilar, T. A., Anguiano-Robledo, L., Madrigal-Bujaidar, E., Álvarez-González, I., dan Chamorro-Cevallos, G. 2018. Morphological and biochemical effects of weekend alcohol consumption in rats: Role of concentration and gender. *World journal of hepatology*. 10(2): 297.

Muriel, P. 2009. Role of Free Radicals in Liver Diseases. *Hepatology international*. 3(4): 526-536.

National Center for Biotechnology Information. 2019. *PubChem Compound Database*; CID=5280863. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280863> [22 Januari 2019]

Nowak-Sliwinska, P., Segura, T., dan Iruela-Arispe, M. L. 2014. The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis*. 17(4): 779-804.

N'nanle, O., Tété-Bénissan, A., Tona, K., Tetch, A., Voemesse, K., Decuypere, E., dan Gbeassor, M. 2017. Effect of in Ovo inoculation of *Moringa oleifera* Leaves Extract on Hatchability and Chicken Growth Performance. *European Poultry Science*. 81.

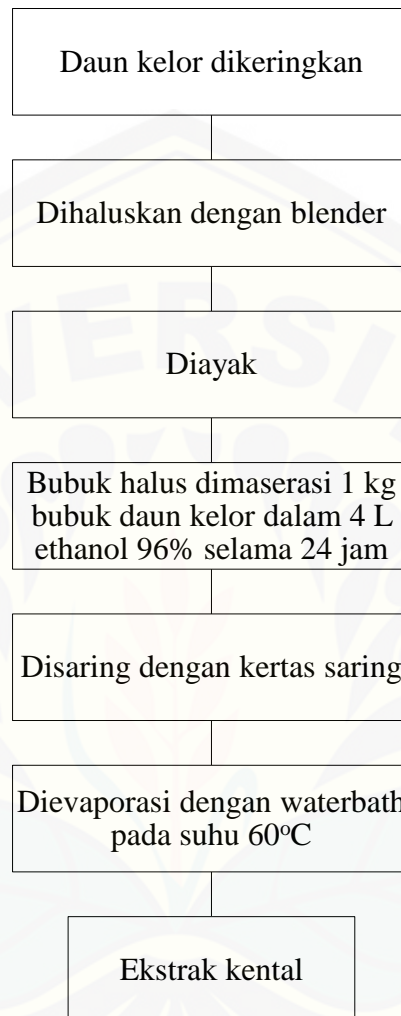
Pari, L. dan Kumar, N. A. 2002. Hepatoprotective Activity of *Moringa oleifera* on Antitubercular Drug-Induced Liver Damage in Rats. *Journal of Medicinal Food*. 5(3): 171-177.

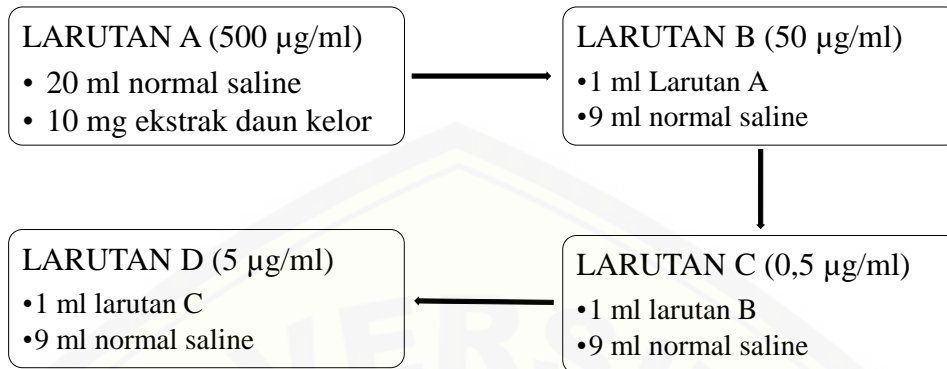
Patasik, Y. Z., Waleleng, B. J., dan Wantania, F. 2015. Profil Pasien Sirosis Hati yang Dirawat Inap di Rsup Prof. Dr. Rd Kandou Manado Periode Agustus 2012–Agustus 2014. *e-Clinic*. 3(1).

- Rasool, M. K., Sabina, E. P., Ramya, S. R., Preeti, P., Patel, S., Mandal, N., Mishra, P. P., dan Samuel, J. 2010. Hepatoprotective and antioxidant effects of gallic acid in paracetamol-induced liver damage in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 62(5): 638-643.
- Ross, M. G., Beall, M. H., dan Christenson, P. D. 2007. Amniotic Fluid Volume and Perinatal Outcome. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 196(3) :17.
- Saalu, L. C., Ogunlade, B., Ajayi, G. O., Oyewopo, A. O., Akunna, G. G., dan Ogunmodede, O. S. 2012. The Hepato-Protective Potentials of *Moringa oleifera* Leaf Extract on Alcohol-Induced Hepato-Toxicity in Wistar Rat. *Am J Biotechnol Mol Sci*. 2(1): 6-14.
- Sardini, S. 2007. Penentuan Aktivitas Enzim GOT dan GPT dalam Serum dengan Metode Reaksi Kinetik Enzimatis sesuai IFCC. *Jakarta: BATAN*.
- Setyawan, D. 2015. KPAI : Pola Konsumsi Miras Dikalangan Remaja Meningkat. <http://www.kpai.go.id/berita/kpai-pola-konsumsi-miras-dikalangan-remaja-meningkat> [akses 23 November 2018].
- Sanches, S. C., Ramalho, L. N. Z., Mendes-Braz, M., Terra, V. A., Cecchini, R., Augusto, M. J., dan Ramalho, F. S. 2014. Riboflavin (vitamin B-2) reduces hepatocellular injury following liver ischaemia and reperfusion in mice. *Food and chemical toxicology*. 67: 65-71.
- Sharifudin, S. A., Fakurazi, S., Hidayat, M. T., Hairuszah, I., Aris Mohd Moklas, M. dan Arulselvan, P. 2013. Therapeutic potential of *Moringa oleifera* extracts against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Pharmaceutical Biology*. 51(3): 279-288.
- Sheid, B. dan Hirschberg, E. 1967. Glutamic Dehydrogenase and Aspartic and Alanine Aminotransferase Activities in Chick Embryo Liver. *American Journal of Physiology-Legacy Content*. 213(5): 1173-1176.
- Shih, T. Y., Young, T. H., Lee, H. S., Hsieh, C. B., dan Hu, O. Y. P. 2013. Protective effects of kaempferol on isoniazid-and rifampicin-induced hepatotoxicity. *The AAPS journal*. 15(3):753-762.
- Stohs, S. J. dan Hartman, M. J. 2015. Review of the Safety and Efficacy of *Moringa oleifera*. *Phytotherapy Research*. 29(6): 796-804.

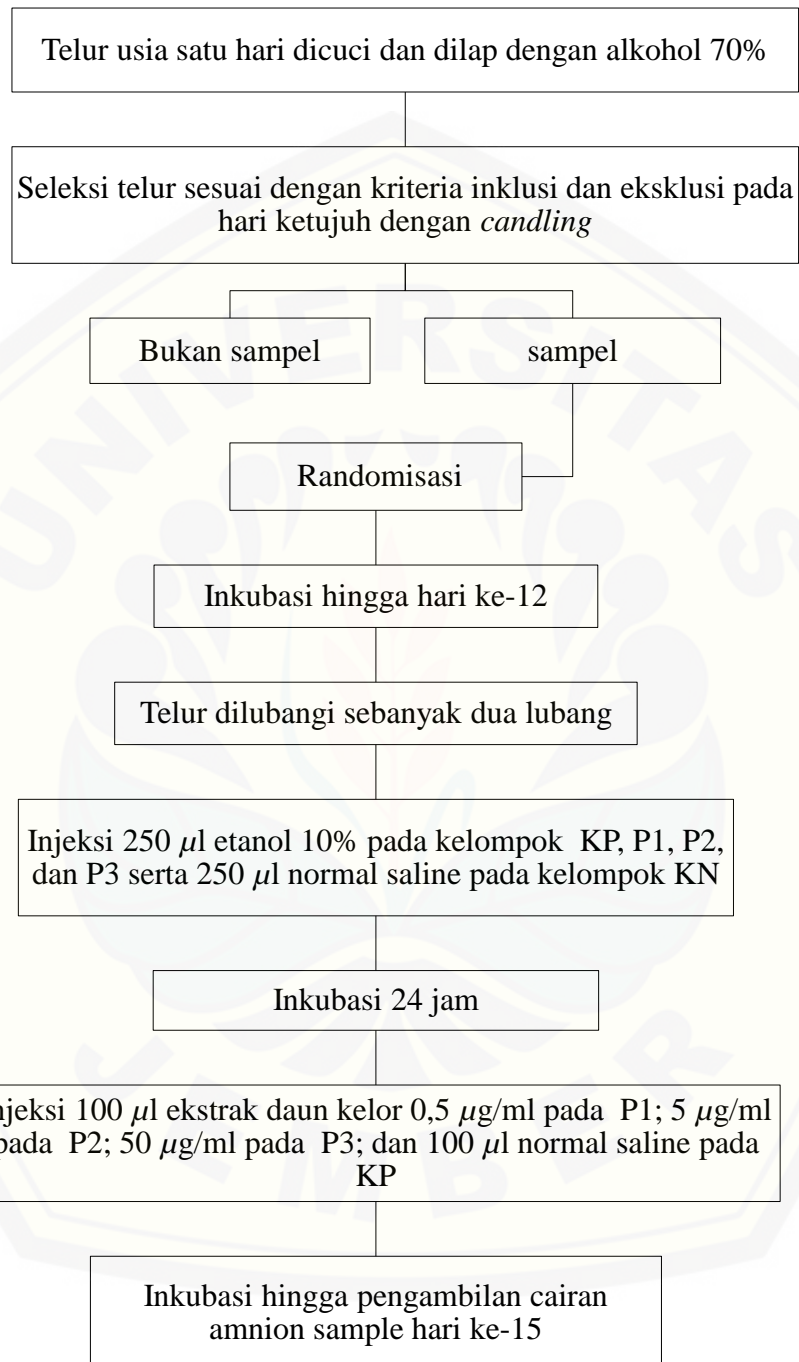
- Sudhakar, D., Kishore, R. K., dan Parthasarathy, P. R. 2010. *Portulaca oleracea* L. Extract Ameliorates the Cisplatin-Induced Toxicity in Chick Embryonic Liver. *Indian Journal of Biochemistry & Biophyscs*. Vol. 47: 185-189.
- Suksaweang, S., Lin, C. M., Jiang, T. X., Hughes, M. W., Widelitz, R. B., dan Chuong, C. M. 2004. Morphogenesis of Chicken Liver: Identification of Localized Growth Zones and the Role of β -Catenin/Wnt in Size Regulation. *Developmental biology*. 266(1): 109-122.
- Susanty, S. dan Bachmid, F., 2016. Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi dan Refluks terhadap Kadar Fenolik dari Ekstrak Tongkol Jagung (*Zea Mays* L.). *Jurnal Konversi*. 5(2): 87-92.
- Tong, X. 2013. Amniotic Fluid May Act as a Transporting Pathway for Signaling Molecules and Stem Cells during the Embryonic Development of Amniotes. *Journal of the Chinese Medical Association*. 76(11): 606-610.
- Triyati, E. 1985. Spektrofotometer Ultra-Violet dan Sinar Tampak serta Aplikasinya dalam Oseanologi. *Jurnal Oseana*. 10(1): 1877.
- Vergara-Jimenez, M., Almatrafi, M. M., dan Fernandez, M. L. 2017. Bioactive Components in *Moringa Oleifera* Leaves Protect Against Chronic Disease. *Antioxidants*. 6(4): 91.
- Vidhya, A. dan Indira, M., 2009. Protective Effect of Quercetin in the Regression of Ethanol-Induced Hepatotoxicity. *Indian journal of pharmaceutical sciences*. 71(5): 527.
- Widodo, S. 1999. Tatalaksana Penetasan Telur Itik. *Lokakarya Fungsional Non Peneliti*. Bogor: balai penelitian ternak. 126-131
- Wikipedia. 2018. *Kelor* . <https://id.wikipedia.org/wiki/Kelor> [23 November 2018].
- Wikipedia. 2018. *Ayam Kampung* . https://id.wikipedia.org/wiki/Ayam_kampung [11 Januari 2018].
- Wang, M., Sun, J., Jiang, Z., Xie, W. dan Zhang, X. 2015. Hepatoprotective effect of kaempferol against alcoholic liver injury in mice. *The American journal of Chinese medicine*. 43(02): 241-254.
- Wong, G. K. and Cavey, M. J. 1992. Development of the Liver in the Chicken Embryo. I. Hepatic Cords and Sinusoids. *The Anatomical Record*. 234(4): 555-567.

- Wu, L., Wang, C., Li, J., Li, S., Feng, J., Liu, T., Xu, S., Wang, W., Lu, X., Chen, K., dan Xia, Y. 2017. Hepatoprotective Effect of Quercetin Via TRAF6/JNK Pathway in Acute Hepatitis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 96:1137-1146.
- Yokouchi, Y., 2005. Establishment of a Chick Embryo Model for Analyzing Liver Development and a Search for Candidate Genes. *Development, Growth & Differentiation*. 47(6): 357-366.
- Zakhari, S. 2006. Overview: how is alcohol metabolized by the body?. *Alcohol Research*. 29(4): 245.
- Zheng, Y. Z., Deng, G., Liang, Q., Chen, D. F., Guo, R., dan Lai, R. C. 2017. Antioxidant Activity of Quercetin and its Glucosides from Propolis: A theoretical study. *Scientific reports*. 7(1): 7543.

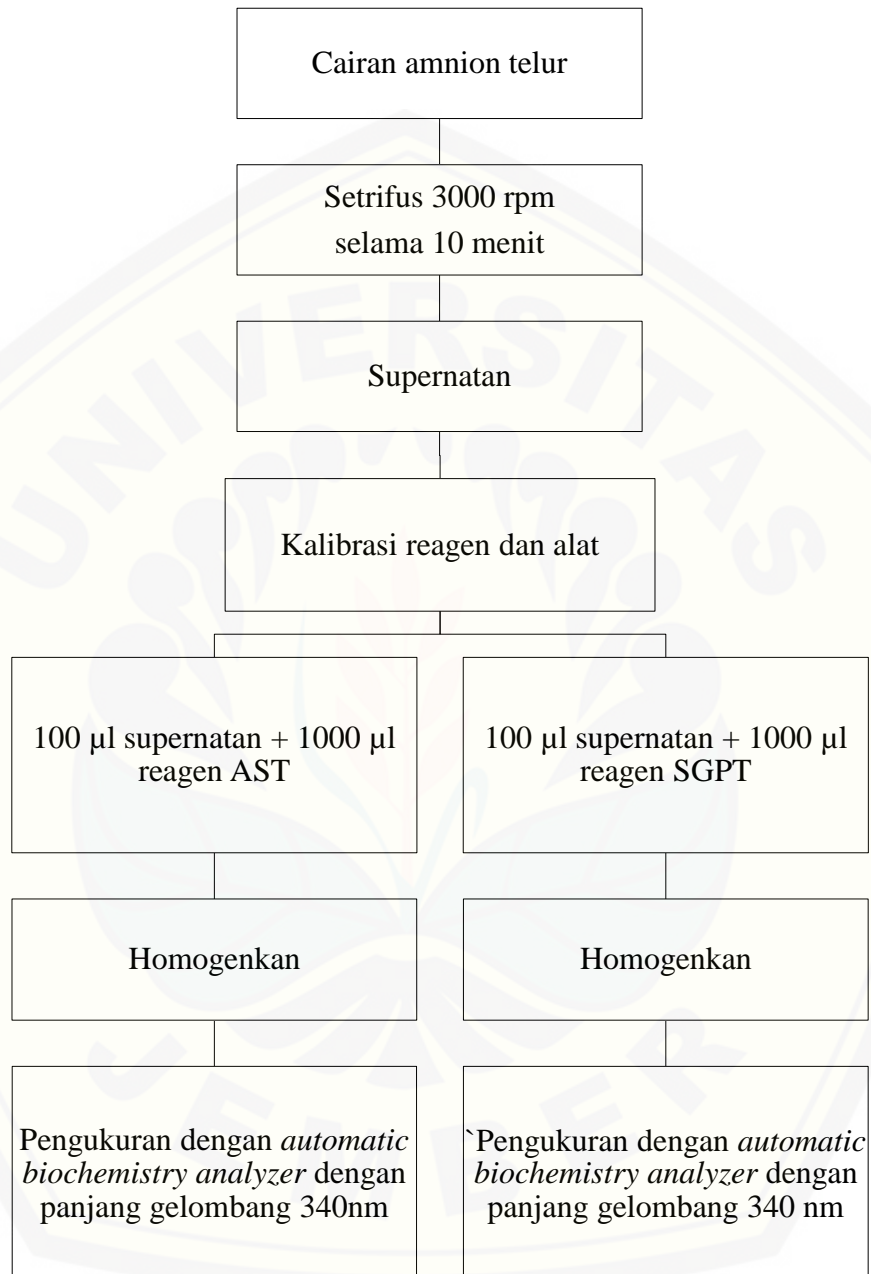
Lampiran 3.1 Skema Alur Ekstraksi Daun Kelor

Lampiran 3.2 Skema Pengenceran Ekstrak Daun Kelor

Lampiran 3.3 Skema Alur Perlakuan



Lampiran 3.4 Tahapan Pengukuran AST dan ALT Sampel



Lampiran 3. 5 Skema Jadwal Perlakuan

Hari / Usia telur	Perlakuan
1	Telur dicuci
2	
3	
4	
5	
6	
7	<i>Candling</i> dan randomisasi
8	
9	
10	
11	
12	Injeksi alkohol
13	Injeksi ekstrak daun kelor
14	
15	Pemeriksaan kadar AST dan ALT embrio ayam

Lampiran 4.1 Keterangan Persetujuan Etik

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 : 1.276 /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 PEMBERIAN EKSTRAK DAUN KELOR (*Moringa aleifera Lamk.*) TERHADAP KADAR AST DAN ALT PADA EMBRIO AYAM YANG DIINDUKSI ALKOHOL

Nama Peneliti Utama : Fais Dina Artika.
Name of the principal investigator

NIM : 152010101027

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Name of institution

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

Jember, 18.01.2019
Ketua Komisi Etik Penelitian

dr. 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 :

1. Mohon diperhatikan, jenis telur yang akan digunakan agar hasil penelitian tidak bias.
2. Mohon diperhatikan, kontrol kualitas telur yang digunakan dalam penelitian meliputi jenis telur, kondisi telur, berat telur, ukuran telur, usia telur, serta warna, untuk mengurangi bias penelitian
3. Mohon diperhatikan dan dicantumkan dalam protokol penelitian alat yang digunakan untuk *candling*.
4. Mohon diperhatikan kontrol kualitas dari sampel amnion yang digunakan untuk pengukuran kadar AST dan ALT.
5. Mohon diperhatikan untuk pengukuran kadar AST dan ALT harus dilakukan oleh tenaga kompeten dilaboratorium yang sesuai agar tidak terjadi bias penelitian.
6. Mohon diperhatikan pembuangan limbah medis dan limbah B3 agar tidak mencemari lingkungan.

Mengetahui
Ketua Komisi Etik Penelitian



dr. Rini Riyanti, Sp.PK

Jember, 15 Januari 2019
Reviewer



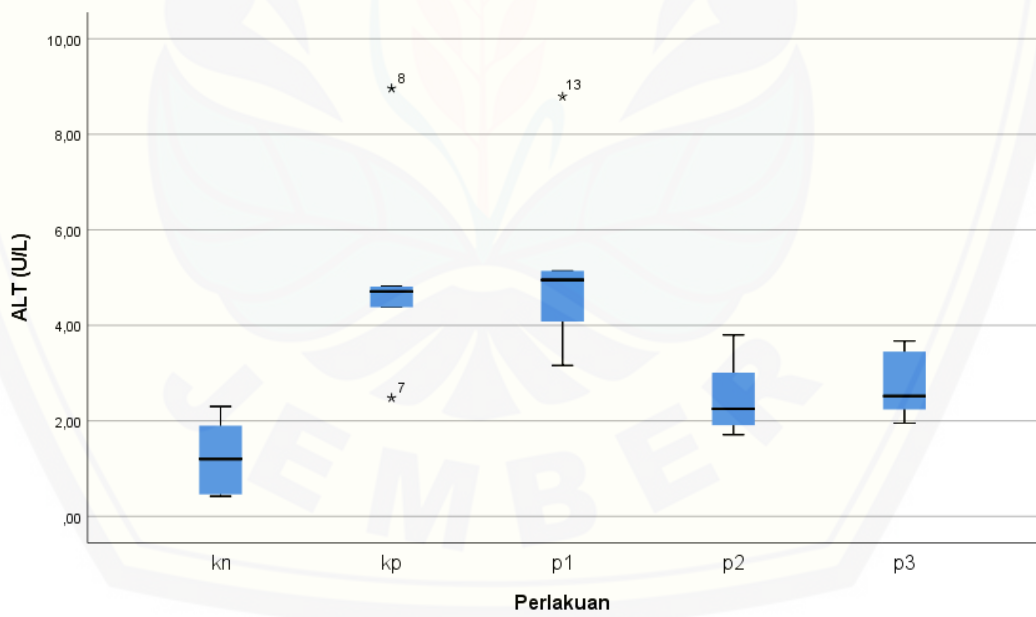
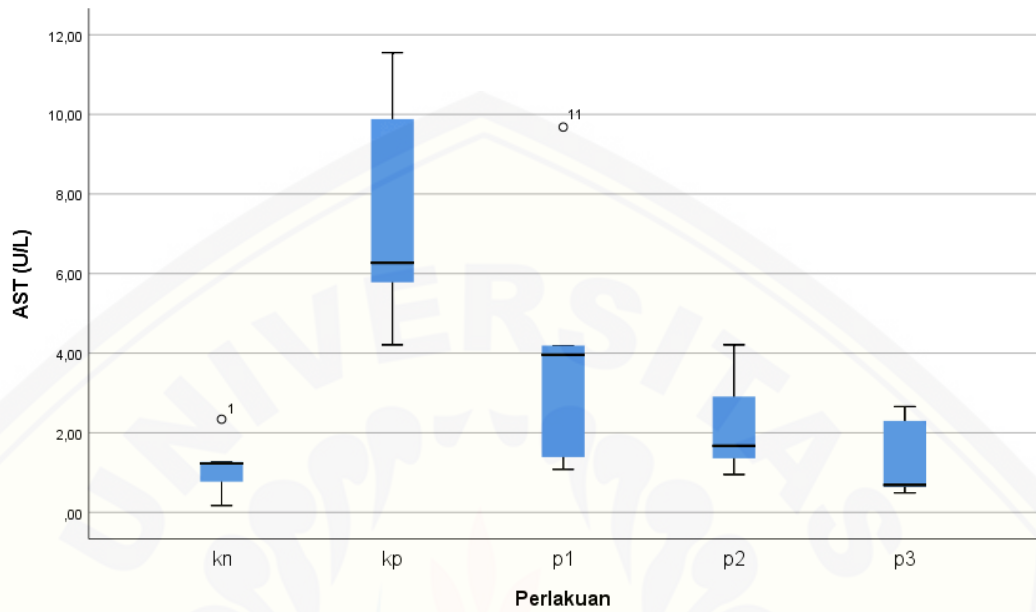
dr. Ayu Munawaroh Aziz, M.Biomed

Lampiran 4.2 Hasil Pengukuran Kadar AST dan ALT

Kelompok	Subyek	AST (U/L)	ALT (U/L)
KN	1	2,34	2,30
	2	0,17	0,42
	3	0,77	0,46
	4	1,23	1,20
	5	1,27	1,90
KP	1	9,88	4,71
	2	6,27	2,48
	3	11,55	8,96
	4	4,21	4,38
	5	5,78	4,81
P1	1	9,68	8,79
	2	1,39	4,95
	3	1,08	3,16
	4	3,96	4,08
	5	4,19	5,14
P2	1	0,95	1,71
	2	4,21	3,80
	3	2,91	3,01
	4	1,36	1,91
	5	1,67	2,25
P3	1	0,69	2,52
	2	0,64	2,24
	3	0,49	1,95
	4	2,66	3,45
	5	2,30	3,67

Lampiran 4.3 Data Statistika

Diagram antar perlakuan



Uji Normalitas

Tests of Normality

	KELOMPOK	Shapiro-Wilk		Sig.
		Statistic	df	
AST	KN	,961	5	,816
	KP	,922	5	,542
	P1	,858	5	,221
	P2	,910	5	,470
	P3	,790	5	,067
ALT	KN	,898	5	,399
	KP	,864	5	,243
	P1	,870	5	,267
	P2	,919	5	,525
	P3	,900	5	,411

Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

		Levene			Sig.
		Statistic	df1	df2	
AST	<i>Based on Mean</i>	2,746	4	20	,057
	<i>Based on Median</i>	1,462	4	20	,251
	<i>Based on Median and with adjusted df</i>	1,462	4	11,320	,277
	<i>Based on trimmed mean</i>	2,661	4	20	,063
ALT	<i>Based on Mean</i>	1,030	4	20	,416
	<i>Based on Median</i>	,614	4	20	,658
	<i>Based on Median and with adjusted df</i>	,614	4	9,723	,663
	<i>Based on trimmed mean</i>	,861	4	20	,504

One Way ANOVA

		ANOVA				
		<i>Sum of Squares</i>	<i>df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F</i>	<i>Sig.</i>
AST	<i>Between Groups</i>	140,374	4	35,093	7,096	,001
	<i>Within Groups</i>	98,906	20	4,945		
	<i>Total</i>	239,280	24			
ALT	<i>Between Groups</i>	59,249	4	14,812	6,047	,002
	<i>Within Groups</i>	48,988	20	2,449		
	<i>Total</i>	108,237	24			

Uji Post hoc LSD

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) kel	(J) kel	Mean	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
			Difference (I-J)			Lower Bound	Upper Bound
AST	KN	KP	-6,38200*	1,40646	,000	-9,3158	-3,4482
		P1	-2,90400	1,40646	,052	-5,8378	,0298
		P2	-1,06400	1,40646	,458	-3,9978	1,8698
		P3	-,20000	1,40646	,888	-3,1338	2,7338
	KP	KN	6,38200*	1,40646	,000	3,4482	9,3158
		P1	3,47800*	1,40646	,022	,5442	6,4118
		P2	5,31800*	1,40646	,001	2,3842	8,2518
		P3	6,18200*	1,40646	,000	3,2482	9,1158
	P1	KN	2,90400	1,40646	,052	-,0298	5,8378
		KP	-3,47800*	1,40646	,022	-6,4118	-,5442
		P2	1,84000	1,40646	,206	-1,0938	4,7738
		P3	2,70400	1,40646	,069	-,2298	5,6378
	P2	KN	1,06400	1,40646	,458	-1,8698	3,9978
		KP	-5,31800*	1,40646	,001	-8,2518	-2,3842
		P1	-1,84000	1,40646	,206	-4,7738	1,0938
		P3	,86400	1,40646	,546	-2,0698	3,7978
P3	KN	,20000	1,40646	,888	-2,7338	3,1338	
	KP	-6,18200*	1,40646	,000	-9,1158	-3,2482	
	P1	-2,70400	1,40646	,069	-5,6378	,2298	
	P2	-,86400	1,40646	,546	-3,7978	2,0698	
ALT	KN	KP	-3,81200*	,98982	,001	-5,8767	-1,7473
		P1	-3,96800*	,98982	,001	-6,0327	-1,9033
		P2	-1,28000	,98982	,211	-3,3447	,7847
		P3	-1,51000	,98982	,143	-3,5747	,5547
	KP	KN	3,81200*	,98982	,001	1,7473	5,8767
		P1	-,15600	,98982	,876	-2,2207	1,9087
		P2	2,53200*	,98982	,019	,4673	4,5967
		P3	2,30200*	,98982	,031	,2373	4,3667
	P1	KN	3,96800*	,98982	,001	1,9033	6,0327
		KP	,15600	,98982	,876	-1,9087	2,2207

	P2	2,68800*	,98982	,013	,6233	4,7527
	P3	2,45800*	,98982	,022	,3933	4,5227
P2	KN	1,28000	,98982	,211	-,7847	3,3447
	KP	-2,53200*	,98982	,019	-4,5967	-,4673
	P1	-2,68800*	,98982	,013	-4,7527	-,6233
	P3	-,23000	,98982	,819	-2,2947	1,8347
P3	KN	1,51000	,98982	,143	-,5547	3,5747
	KP	-2,30200*	,98982	,031	-4,3667	-,2373
	P1	-2,45800*	,98982	,022	-4,5227	-,3933
	P2	,23000	,98982	,819	-1,8347	2,2947



Lampiran 4.4 Rekomendasi Bebas Plagiasi**KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGIDAN 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 : 52 /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 PEMBERIAN EKSTRAK DAUN KELOR (*Moringa oleifera Lamk.*)
TERHADAP KADAR AST DAN ALT PADA EMBRIO AYAM YANG DIINDUKSI
ALKOHOL**

Nama Penulis : Fais Dina Artika
NIM. : 152010101027
Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Telah menyetujui dan dinyatakan "**BEBAS PLAGIASI**"

Surat Rekomendasi ini dapat digunakan sebagaimana mestinya.



Jember, 23 Januari 2019
Ketua
Komisi Bimbingan Skripsi & Ilmiah

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

Lampiran 4.5 Dokumentasi



Pengeringan daun kelor



Penimbangan bubuk daun kelor



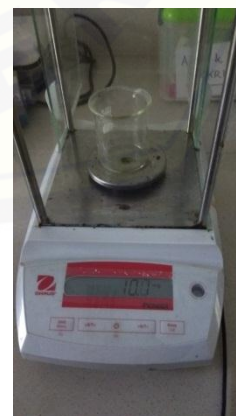
Maserasi bubuk daun kelor



Penyaringan hasil maserasi



Evaporasi hasil maserasi



Penimbangan ekstrak



Homogenisasi larutan A



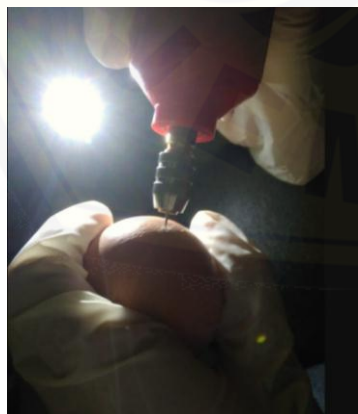
Candling telur dengan gambaran gelap dan bayangan pembuluh darah



Inkubasi telur



Injeksi etanol 10%



Melubangi telur dengan *minidrill*



Pemecahan telur



Injeksi ekstrak kelor



Reagen ALT



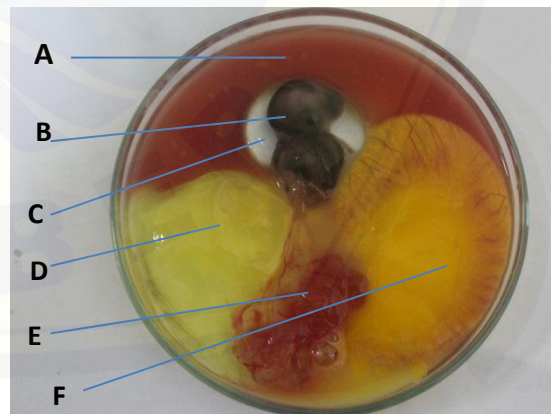
Pengambilan amnion telur



Reagen AST

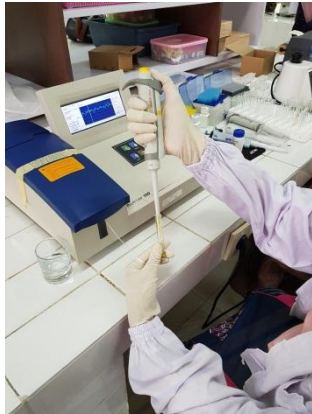


Sentrifugasi amnion sampel



(A) Cairan Allantois, (B) Cairan Amnion, (C) Embrio, (D) Albumin, (E) membran korioalantois, (F) Yolk sak.

Telur berembrio usia hari ke 15



Pengukuran kadar AST dan ALT



Ekstrak semi kental daun kelor

