

**PENGARUH EKSTRAK DAUN KELOR (*Moringa
oleifera Lam.*) TERHADAP KADAR TNF- α DAN IL-1
PADA KEADAAN HIPERLIPIDEMIA
(Studi Eksperimental pada Tikus Jantan Galur *Sprague dawley*)**

Tesis

Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Magister
(S2)



Magister Ilmu Biomedik
Muchlis Munawar
MBK.22.20.010321

PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG

2025

TESIS

PENGARUH EKSTRAK DAUN KELOR (*Moringa oleifera lam.*) TERHADAP KADAR TNF-a DAN IL-1 PADA KEADAAN HIPERLIPIDEMIA

(Studi Eksperimental pada Tikus Jantan Galur *Sprague dawley*)

disusun oleh

Muchlis Munawar

MBK.22.20.010321

Yang dipertahankan didepan Tim Penguji

Padatanggal 31 Januari 2025

dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,

Pembimbing I

Pembimbing II


Dr. dr. Joko Wahyu W, M.Kes

NIP. 210 198 046


Dr. dr. H, Setyo Trisnadi, S.H., Sp.KF

NIP. 210 199 049

Mengetahui,

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik

Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung


Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B., FINACS

NIP. 210 113 160

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah benar-benar karya saya sendiri dan didalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar magister di suatu perguruan tinggi dan Lembaga Pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum/tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar Pustaka.

Semarang, 31 Januari 2025



(Muchlis Munawar)

KATA PENGANTAR

Puji syukur keadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayahnya sehingga penyusun dapat menyelesaikan penyusunan proposal tesis dengan judul **“Pengaruh Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lam.) Terhadap Kadar TNF- α DAN IL-1 Pada Keadaan Hiperlipidemia (Studi Eksperimental pada Tikus Jantan Galur *Sprague dawley*)”**.

Pada penyusunan tesis ini penyusun mendapat bantuan pengarahan dan bimbingan, untuk itu pada penyusun ingin mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya pada yang terhormat :

1. Prof. Dr. H. Gunarto, SH., M.Hum selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung beserta para wakil rektor yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh dan menyelesaikan Pendidikan Magister Ilmu Biomedik.
2. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, Sp.KF, SH selaku dekan Fakultas Kedokteran UNISSULA yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti pendidikan di program Magister Ilmu Biomedik.
3. Dr. dr. Eko Setiawan Sp.B., FINACS selaku ketua Program Studi Magister Ilmu yang telah memberikan kesempatan dan memfasilitasi penulis untuk mengikuti pendidikan di program Magister Ilmu Biomedik.
4. Dr. dr. Joko Wahyu, M.Kes selaku pembimbing I yang telah memberikan dorongan, semangat, bimbingan masukan penulis selama penyusunan tesis ini.
5. Dr. dr. Setyo Trisnadi, Sp.KF, SH. selaku pembimbing II yang telah memberikan dorongan, semangat bimbingan masukan penulis selama penyusunan tesis ini.
6. Dr. dr. Chodijah. M.Kes selaku penguji I yang telah memberikan dorongan, semangat bimbingan masukan penulis selama penyusunan tesis ini.
7. Prof. Dr. Ir. Titiek Sumarawati, M.Kes. selaku penguji II yang telah memberikan dorongan, semangat bimbingan masukan penulis selama penyusunan tesis ini.
8. Dr. dr. Eko Setiawan Sp.B., FINACS selaku penguji III yang telah memberikan

dorongan, semangat bimbingan masukan penulis selama penyusunan tesis ini.

9. Seluruh dosen pengajar dan staf Magister Ilmu Biomedik yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan doa dan dorongan kepada penyusun.
10. Kedua orang tua yang telah memberikan dorongan, serta doa sehingga proposal tesis ini dapat terselesaikan.
11. Safitri Muamartiningsih selaku Istri tersayang beserta Tazkiya Prameswari Almunawar sebagai Anak tercinta yang mana keduanya senantiasa memberikan keikhlasan dan dukungan kepada penulis.
12. Seluruh pihak yang telah membantu dalam penyusunan tesis yang tidak bisa disebutkan satu persatu.

Penulis berharap tesis ini dapat memberikan manfaat bagi penulis pribadi, bagi Program Studi Magister Ilmu Biomedik serta bagi pihak-pihak lain yang berkepentingan. Akhir kata semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan berkah dan rahmatnya kepada kita semua, amin

Semarang, Januari 2025

(Muchlis Munawar)

DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN	ii
SURAT PERNYATAAN	iii
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR SINGKATAN	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR GRAFIK.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
ABSTRAK.....	xv
<i>ABSTRACT</i>	xvi
BAB I.....	1
PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Penelitian.....	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1. Umum.....	3
1.3.2. Khusus.....	4
1.4. Manfaat Penelitian.....	4
1.4.1. Teoritis.....	4
1.4.2. Praktis.....	4
1.5. Originalitas Penelitian	4
BAB II	7
TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 TNF-Alpha	7
2.1.1 Struktur TNF-Alpha	8
2.1.2 Bentuk Sekresi dan Fungsi Biologis TNF-Alpha.....	9
2.1.3 Ekspresi TNF-Alpha.....	10
2.1.4 Faktor yang mempengaruhi kadar TNF-Alpha	12
2.1.5 Metode Pemeriksaan Kadar TNF-Alpha.....	12
2.2 IL-1	14

2.2.1	Peran <i>Interleukin-1</i> (IL-1) dalam Inflamasi	14
2.2.2	Mekanisme kerja molekuler <i>Interleukin-1</i>	16
2.2.3	Faktor-Faktor yang mempengaruhi IL-1.....	18
2.2.4.	Metode Pemeriksaan IL-1	19
2.3.	Ekstrak Daun Kelor (<i>Moringa oleifera Lam.</i>)	20
2.4.3.	Definisi.....	20
2.4.4.	Kandungan Zat Aktif Daun Kelor (<i>Moringa oleifera Lam.</i>)	22
2.4.5.	Manfaat Daun Kelor (<i>Moringa oleifera lam.</i>).....	22
2.4.	Hiperlipidemia.....	23
2.5.	Pengaruh Ekstrak Daun Kelor (<i>Moringa oleifera Lam.</i>) terhadap Kadar TNF- α dan IL-1 pada Tikus Hiperlipidemia.....	25
BAB III		28
KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS.....		28
3.1.	Kerangka Teori.....	28
3.2.	Kerangka Konsep.....	31
3.3.	Hipotesis Penelitian.....	31
BAB IV		32
METODE PENELITIAN		32
4.1.	Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	32
4.2.	Populasi dan Teknik Pengambilan Sampel	32
4.2.1.	Populasi dan Sampel	32
4.2.2.	Besar Sampel.....	33
4.2.3.	Cara Pengambilan Sampel Penelitian	33
4.2.4.	Kriteria Inklusi	33
4.3.	Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	34
4.3.1.	Variabel	34
4.3.2.	Definisi Operasional.....	34
4.4.	Alat dan Bahan Penelitian	35
4.4.1.	Alat.....	35
4.4.2.	Bahan	36
4.5.	Prosedur Penelitian.....	36
4.5.1.	Cara Pembuatan Ekstrak Daun Kelor (<i>Moringa Oleifera Lam.</i>).....	36
4.5.2.	Konfirmasi Fitokimia Ekstrak Daun Kelor.....	37

4.5.3.	Penetapan Dosis	37
4.5.4.	Komposisi Diet Tinggi Lemak.....	38
4.5.5.	Validasi Hiperlipidemia	38
4.5.6.	Persiapan Sebelum Perlakuan.....	39
4.5.7.	Prosedur Pengambilan Sampel Sebagai Spesimen.....	40
4.5.8.	Preparasi Spesimen.....	40
4.5.9.	Pemeriksaan Kadar TNF- α dan IL-1	41
4.6.	Alur Penelitian	43
4.7.	Analisa Data	44
BAB V		45
HASIL DAN PEMBAHASAN		45
5.1. Hasil Penelitian	45	
5.1.1.	Ekstraksi Daun Kelor dan Konfirmasi Fitokimia GC-MS	45
5.1.2.	Validasi Kondisi Hiperlipidemia	47
5.1.3.	Pengukuran Kadar Interleukin-1 (IL-1).....	51
5.1.4.	Pengukuran Kadar Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α).....	52
5.2. Pembahasan.....	52	
BAB VI.....	57	
6.1. Kesimpulan.....	57	
6.2. Saran	57	
DAFTAR PUSTAKA.....	58	
LAMPIRAN.....	65	

DAFTAR SINGKATAN



HDL	: <i>High-Density Lipoprotein</i>
IFN- γ	: <i>Interferon Gamma</i>
IL-1	: <i>Interleukin-1</i>
JAK-1	: <i>Janus Kinase</i>
LDL	: <i>Low-Density Lipoprotein</i>
MDA	: <i>Malondialdehyd</i>
NF-kb	: <i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
P13K	: <i>Phosphatidylinositol-3-kinase</i>
PDGF	: <i>Platelet Derived Growth Factor</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
RTK	: <i>Receptor Tyrosine Kinases</i>
SGOT	: <i>Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase</i>
SGPT	: <i>Serum Glutamic Pyruvic Transaminase</i>
SOCS3	: <i>Suppressor of cytokine signaling 3</i>
STAT-3	: <i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
TNF α	: <i>Tumor Necrosis Factor-α</i>
TYK2	: <i>Tyrosine Kinase 2</i>

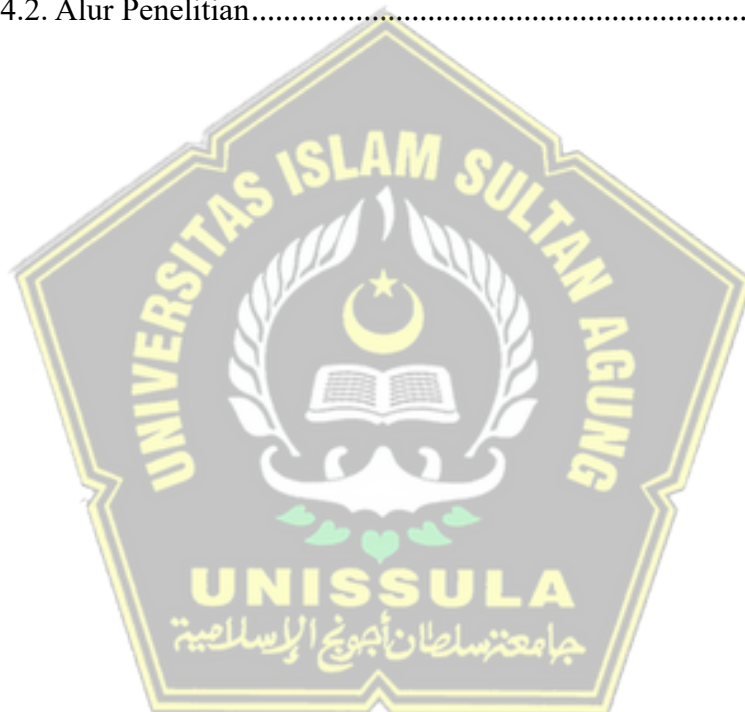
DAFTAR TABEL

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian	5
Tabel 4.1. Komposisi Diet Tinggi Lemak	38
Tabel 4.2. Validasi Hiperlipidemia Tikus <i>Sprague dawley</i>	39
Tabel 5.1. Konfirmasi Fitokimia GC-MS Ekstrak Daun Kelor	46
Tabel 5.2. Perbandingan Nilai Rerata Massa Tikus	47
Tabel 5.3. Hasil Validasi Kadar Kolesterol Total Tikus <i>Sprague dawley</i>	48
Tabel 5.4. Analisis Kadar Kolesterol Total Pasca Perlakuan	50
Tabel 5.5. Uji Pos Hoc Kolesterol Total	50
Tabel 5.6. Analisis Pengukuran Kadar IL-1	51
Tabel 5.7. Uji Pos Hoc IL-1	51
Tabel 5.8 Analisis Pengukuran Kadar TNF- α	52



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Struktur TNF-Alpha	8
Gambar 2.2. Skema Ikatan TNF-Alpha dengan reseptornya	9
Gambar 2.4. Ilustrasi Skema Persinyalan IL-1	12
Gambar 2.5. Daun Kelor dan Bunganya	21
Gambar 3.1. Kerangka Teori	30
Gambar 3.2. Kerangka Konsep	31
Gambar 4.1. Skema Rancangan Penelitian	32
Gambar 4.2. Alur Penelitian.....	43



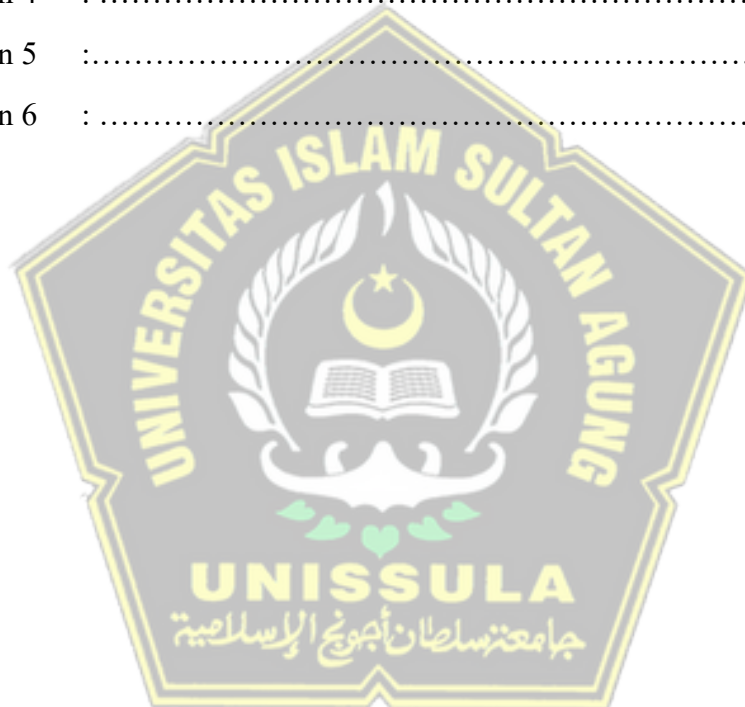
DAFTAR GRAFIK

Grafik 5.1. Grafik kadar Rerata Kolesterol Total	49
--	----



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	:		65
Lampiran 2	:		67
Lampiran 3	:		68
Lampiran 4	:		72
Lampiran 5	:		73
Lampiran 6	:		74



ABSTRAK

Latar Belakang: Hiperlipidemia merupakan faktor risiko berbagai penyakit metabolik. Penggunaan obat golongan statin pada hiperlipidemia memiliki resiko efek samping. Ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera L.*) sebagai alternatif obat hiperlipidemia telah banyak dilakukan penelitian pada aspek metabolomik, sehingga penelitian pengaruh ekstrak daun kelor pada aspek proteomik diperlukan sebagai penelitian lebih lanjut, khususnya aspek sitokin inflamasi IL-1 (*Interleukin-1*) dan TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*) pada kondisi hiperlipidemia.

Tujuan: Membuktikan adanya pengaruh ekstrak daun kelor terhadap kadar IL-1 dan kadar TNF- α pada keadaan hiperlipidemia

Metode: Penelitian eksperimental dengan rancangan *Post Test Only Control Group Design* sampel 20 ekor tikus jantan *Sprague dawley*, terbagi 4 kelompok. Tikus diinduksi diet tinggi lemak selama 4 minggu hingga hiperlipidemia. Masing-masing kelompok perlakuan K1 (aquadest), K2 (atorvastatin 5 mg/KgBB), K3 dan K4 diberikan ekstrak daun kelor berturut sebesar 400 mg/KgBB dan 800 mg/kgBB secara sonde selama 14 hari, kemudian dipuasakan selama 12 jam untuk diambil dan diukur kadar IL-1 dan TNF- α sampel darah menggunakan ELISA.

Hasil: Rerata kadar IL-1 didapatkan pada K3 dan K4 berturut 15.33 pg/mL dan 24.07 pg/mL. Uji *One Way Anova* hasil $p \leq 0.03$ menunjukkan perbedaan bermakna pada rerata kadar IL-1, dengan uji *Post Hoc* perbedaan bermakna pada K1 dengan K4 ($p = 0.003$). Rerata kadar TNF- α didapatkan berturut 79.25 pg/mL dan 65.48pg/mL pada K3 dan K4. Uji *One Way Anova* $p > 0.05$ menunjukkan tidak adanya perbedaan bermakna antar kelompok.

Kesimpulan: Kadar IL-1 terbukti lebih rendah pada kelompok ekstrak daun kelor 800mg/kgBB. Kadar TNF- α tidak terdapat perbedaan bermakna pada semua kelompok perlakuan ekstrak daun kelor.

Kata Kunci: Hiperlipidemia, *Moringa oleifera L.*, IL-1, TNF- α

ABSTRACT

Background: Hyperlipidemia is a risk factor for various metabolic diseases. The use of statin drugs for hyperlipidemia carries a risk of side effects. Moringa leaf extract (*Moringa oleifera* L.) as an alternative drug for hyperlipidemia has carried out a lot of research on the metabolomic aspect, so further research is needed on the influence of Moringa leaf extract on the proteomic aspect, especially the inflammatory cytokine aspect IL-1 (Interleukin-1) and TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) in hyperlipidemia conditions. **Objective:** To prove the effect of Moringa leaf extract on IL-1 and TNF- α levels in hyperlipidemia.

Method: Experimental research with a Post Test Only Control Group Design, a sample of 20 male Sprague Dawley rats, divided into 4 groups. Mice were induced on a high-fat diet for 4 weeks to develop hyperlipidemia. Each treatment group K1 (aquadest), K2 (atorvastatin 5 mg/KgBW), K3 and K4 were given moringa leaf extract at 400 mg/KgBW and 800 mg/kgBW respectively for 14 days, then fasted for 12 hours to collect and measure the levels of IL-1 and TNF- α in blood samples using ELISA.

Results: The mean IL-1 levels obtained in K3 and K4 were 15.33 pg/mL and 24.07 pg/mL, respectively. One Way Anova test results $p \leq 0.03$ showed a significant difference in mean IL-1 levels, with a Post Hoc test a significant difference in K1 and K4 ($p = 0.003$). The mean TNF- α levels were found to be 79.25 pg/mL and 65.48pg/mL at K3 and K4, respectively. One Way Anova test $p > 0.05$ showed there were no significant differences between groups.

Conclusion: IL-1 levels were proven to be lower in the 800mg/kgBB Moringa leaf extract group. There were no significant differences in TNF- α levels in all Moringa leaf extract treatment groups.

keywords: Hiperlipidemia, *Moringa oleifera* L., IL-1, TNF- α

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Hiperlipidemia merupakan salah satu kondisi yang menjadi faktor risiko munculnya beberapa penyakit. Kondisi hiperlipidemia didefinisikan kondisi tingginya kadar kolesterol, trigliserida dan juga LDL didalam tubuh¹; Beberapa jenis obat untuk mengatasi hiperlipidemia seperti statin, fibrat, niasin, diketahui mampu menurunkan kadar kolesterol dengan kondisi yang berbeda dengan tingkat kemanjuran yang telah terbukti. Namun demikian, obat-obatan jenis allopatik tersebut memiliki banyak efek samping kepada pasiennya, seperti nyeri, gangguan neurologis hingga kerusakan hati.² Obat alternatif dibutuhkan dalam mengobati hiperlipidemia, sebagai solusi lain penggunaan obat allopatik. Hiperlipidemia sendiri secara ekspresi merupakan akibat kenaikan ROS secara akumulatif dan signifikan yang akan menyebabkan inflamasi, merusak vaskuler dan menyebabkan kenaikan sitokin pro-inflamasi termasuk didalamnya TNF- α dan IL-1. Tanaman kelor memiliki potensi sebagai obat herbal karena banyak mengandung vitamin, polifenol dan antioksidan, lain yang dipercaya dapat menekan pertumbuhan ROS sebagai akibat keadaan hiperlipidemia.³ Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa daun kelor memiliki efek dalam menurunkan kadar kolesterol, trigliserid, LDL, MDA, SGOT dan SGPT pada tikus yang diinduksi menggunakan pakan tinggi lemak.⁴ Penelitian mengenai hubungan pemberian ekstrak daun kelor terhadap ekspresi genetik pada kasus

hiperlipidemia yang masih terbatas, khususnya pada ekspresi genetik sitokin pro-inflamasi ; TNF- α dan IL-1; sehingga diperlukan penelitian mengenai pengaruh pemberian ekstrak daun kelor dengan kadar TNF- α dan IL-1 pada hiperlipidemia.

Indonesia menempati posisi sepuluh besar negara dengan penduduk kadar kolesterol non-HDL tertinggi pada tahun 2018, hal tersebut merupakan sebuah peningkatan yang signifikan dimulai sejak tahun 1980.⁵ Penelitian mengenai kadar kolesterol yang dilaksanakan pada tahun 2018, menunjukkan hasil bahwa sekitar 28,8% penduduk Indonesia dengan usia diatas 15 tahun memiliki kadar kolesterol yang abnormal.⁶ Kadar Kolesterol abnormal memicu risiko penyakit jantung,⁷ dengan total sekitar 1.72% populasi dunia memiliki risiko penyakit jantung,⁸ dengan hampir total sekitar Sembilan (9) juta kematian akibat penyakit jantung, serta sekitar 3.8 juta yang meninggal dunia didalamnya merupakan pasien dengan kadar kolesterol LDL yang tinggi.¹⁰ Tingginya angka hiperlipidemia baik secara global maupun nasional perlu adanya tindakan dan penanganan agar mampu menekan faktor risiko penyakit metabolik, terlebih menekan angka kematian akibat kondisi hiperlipidemia.

Tanaman kelor; *Moringa oliefera Lam.*; memiliki kandungan tinggi protein; sekitar 28.65%; dan kaya akan antioksidan, vitamin C, vitamin A dan Fosfor,¹¹ merupakan jenis tanaman yang mudah ditemukan di Indonesia. Senyawa Bioaktif yang berasal dari tanaman kelor mengandung lebih dari 24 jenis senyawa yang berfungsi sebagai anti-obesitas, misalnya regulasi profil lipid plasma, penghambatan lipase, induksi anoreksia, regulasi ekspresi

gen peningkatan ekspresi PPAR- α dan PPAR- β .¹ Selain itu, Kelor dipercaya sebagai obat kardioprotektif, ekstrak daun kelor ditemukan memiliki efek anti-hiperkloesterolemia pada kelinci yang di induksi makanan tinggi lemak.¹²

Potensi farmakologi pada kelor ini menjadikan adanya ketertarikan terhadap penelitian mengenai pemberian ekstrak daun kelor terhadap kondisi hiperlipidemia. Urgensi untuk menurunkan angka hiperlipidemia yang cukup tinggi terutama di Indonesia, serta untuk mendukung data-data mengenai penggunaan tanaman kelor sebagai alternatif pengobatan di masyarakat. Penelitian terdahulu mengenai pemanfaatan ekstrak daun kelor masih pada cakupan metabolik, pengaruhnya terhadap berat badan total, kolesterol total, LDL dan HDL, menjadikan penulis untuk meneliti lebih lanjut pada tahapan proteomiknya, mengenai aspek dan potensi ekstrak daun kelor dalam memberikan pengaruh terhadap kadar TNF- α dan IL-1 pada tikus yang diinduksi diet tinggi lemak sebagai indikator hiperlipidemia.

1.2. Rumusan Penelitian

“Apakah ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) berpengaruh terhadap kadar TNF- α dan IL-1 pada keadaan hiperlipidemia?”

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Umum

Membuktikan pengaruh ekstrak daun kelor terhadap kadar TNF- α dan IL-1 pada keadaan hiperlipidemia.

1.3.2. Khusus

1. Membuktikan perbedaan rerata kadar TNF- α pada tikus yang diberi aquades, atorvastatin, ekstrak daun kelor dosis 400mg/kgBB/hari dan 800mg/kgBB/hari
2. Membuktikan perbedaan rerata kadar IL-1 pada tikus yang diberi aquades, atorvastatin, ekstrak daun kelor dosis 400mg/kgBB/hari dan 800mg/kgBB/hari

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Teoritis

1. Sebagai bahan acuan untuk melakukan penelitian lebih lanjut tentang ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera Lam.*)
2. Sebagai bahan informasi dan bahan kajian mengenai ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera Lam.*) terhadap kadar TNF- α dan IL-1 pada serum darah tikus yang diinduksi diet tinggi lemak.

1.4.2. Praktis

Sebagai sumber informasi masyarakat bahwa ekstrak daun kelor berpengaruh terhadap kadar lipid (TNF- α dan IL-1) dalam darah pada serum darah tikus yang diberi diet tinggi lemak.

1.5. Originalitas Penelitian

Tabel 1.0-1. Originalitas Penelitian

No.	Peneliti, tahun	Judul	Metode	Hasil
1.	Onwe P.E., et al., 2015. ¹²	<i>Extracts of Moringa oleifera a sure bet for Hiperlipidemiaa management</i>	In vivo (Tikus)	Pemberian Ekstrak Daun Kelor pada Kelompok hewan coba terjadi penurunan kolesterol

				total, trigliserid dan LDL, dan kenaikan pada HDL.
2.	Shahinaz A. Helmy, et al., 2017. ¹³	<i>Hypolipidemic Effect of Moringa oleifera Lam Leaf Powder and its Extract in Diet-Induced Hypercholesterolemic Rats</i>	In vivo (tikus)	Sejumlah Ekstrak Daun Kelor dengan dosis 400mg/kgBB/hari diberikan pada hewan coba memiliki dampak terjadinya penurunan kolesterol, trigliserid, LDL, MDA, SGOT, SGPT pada tikus yang diinduksi diet tinggi lemak
3.	Manal, Muse. A. et al., 2017.	<i>Moringa Leaves Prevent Hepatic Lipid Accumulation and Inflammation in Guinea Pigs by Reducing the Expression of Genes Involved in Lipid Metabolism</i>	In vivo (hamster)	Penelitian ini ekstrak Moringa oleifera mencegah steatosis hati, berpengaruh pada ekspresi gen sintesis lipid; yang berhubungan dengan liver; sehingga menurunkan konsentrasi kolesterol dan trigliserida, serta berkurangnya inflamasi hati.
3.	Shahira M. Ezzat, et.al, 2020. ¹	<i>Upregulation of MC4R and PPAR-α expression mediates the antiobesity activity of Moringa oleifera Lam. in high-fat diet-induced obesity in rats</i>	In Vivo (tikus)	Sejumlah Ekstrak Daun Kelor dengan dosis 400mg/kgBB/hari diberikan pada hewan coba memberikan dampak signifikan terhadap penurunan total berat badan, indeks adiposite, serta penurunan leptin dan vaspin, dampak lainnya berupa pengaruhnya terhadap ekspresi adiponektin pada tikus yang diinduksi dengan diet tinggi lemak.

Berdasarkan penelitian sebelumnya, didapatkan fakta-fakta bahwa ekstrak daun kelor terbukti dapat menjadi pilihan pengobatan hiperlipidemiaa, karena memiliki kemampuan untuk menurunkan kolesterol total, trigliserid dan LDL dan menaikkan kadar HDL, serta terbukti memberikan dampak terhadap ekspresi sel adiponektin. Pada penelitian yang terdahulu tersebut memiliki perbedaan dengan penelitian yang akan kami laksanakan, hal tersebut terletak pada perbedaan bahwa penelitian yang akan kami lakukan focus untuk melihat pengaruh ekstrak daun kelor terhadap kadar TNF- α dan IL-1 pada tikus yang diinduksi diet tinggi lemak.

Pada penelitian yang dilaksanakan dengan hewan coba babi guinea ditemukan fakta bahwa ekstrak daun kelor juga telah terbukti memiliki efek terhadap metabolisme lipid pada organ liver, Penelitian yang lainnya menunjukkan penggunaan dosis ekstrak daun kelor sebanyak 200 mg dan 400 mg selama 60 hari. Sedangkan pada penelitian ini, dosis yang digunakan 400 mg dan 800 mg selama 14 hari.^{13,15} Dari berbagai penelitian terdahulu secara signifikan parameter kadar IL-1 sebagai wujud manifestasi pro-inflamasi belum dijadikan sebagai indikator utama didalam penelitian. Sedangkan penelitian terdahulu tentang ekstrak daun kelor terhadap kadar TNF- α pada kasus hiperlipidemiaa masih minim dijadikan indikator dalam penelitian.

BAB II

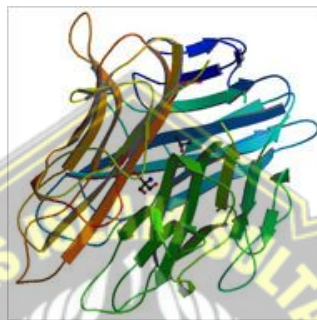
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 TNF-Alpha

Tumor Necrosis Factor- Alpha (TNF- α) merupakan salah satu jenis jenis protein didalam tubuh manusia.¹⁵ yang keberadaan TNF- α awalnya dikenal sebagai faktor yang menyebabkan nekrosis tumor,¹⁶ yang dalam hal ini termasuk kedalam jenis pro-inflamasi dengan beragam efek biologis.¹⁷ Keberadaan dari protein TNF- α ini sendiri diproduksi oleh makrofag/monosit ketika terjadi peradangan akut, serta bertanggung jawab atas berbagai macam peristiwa pensinyalan dalam sel; yang menyebabkan nekrosis atau apoptosis; protein ini juga penting sebagai wujud pertahanan terhadap infeksi dan kanker.¹⁸ TNF awalnya diproduksi sebagai protein transmembran tipe II (tmTNF), yang kemudian dibelah oleh enzim pengubah TNF- α (TACE) menjadi bentuk yang larut (sTNF) dan disekresikan dari sel.¹⁹ Kehadiran TNF- α dan reseptornya diekspresikan secara luas dalam organ yang sedang berkembang, dan keduanya mengatur kelangsungan hidup, proliferasi, dan apoptosis sel punca embrionik (ESC) dan sel progenitor. Didalam ekspresinya keberadaan TNF- α didahului adanya prekursor TNF- α (pro-TNF- α), yang dalam hal ini berbentuk sebagai protein trans-membran tipe II dengan berat molekul 26 kDa, dengan unsur penyusun berupa TNF- α matang dan sekuens pemimpin, yang mengandung domain sitoplasma, domain transmembran, dan domain ekstraseluler. Didalam tubuh terdapat dua (2) reseptor TNF-alpha, yakni TNF-R1

(reseptor TNF tipe 1; CD120a; p55/60) dan TNF-R2 (reseptor TNF tipe 2; CD120b; p75/80), yang dalam hal ini mengikat TNF- α .²⁰ yang dalam hal ini TNF- α dikodekan oleh gen 3-kb yang terletak pada kromosom 6p21.3 dan terdiri dari empat ekson.²¹

2.1.1 Struktur TNF-Alpha

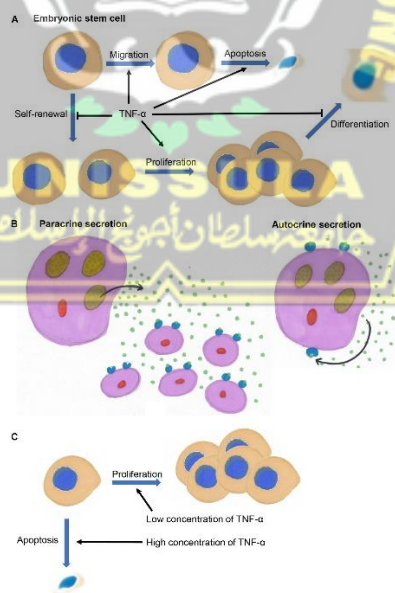


Gambar 2.1. Struktur 3D TNF- α ²⁰

TNF- α termasuk kedalam protein, yang tersusun atas 233 asam amino yang mana memiliki kesesuaian model atom dengan urutan asam amino berupa rantai polipeptida yang disintesis sebagai pro-hormon dengan urutan sinyal yang luar biasa panjang dan atipikal, yang tidak ada dalam proses sekresi pematangan sitokin.²² Struktur dari TNF-alfa dapat ditentukan melalui Sinar-X Kristalography dengan resolusi 2.6 Å,²³ diketahui bahwa dalam strukturnya dibangun oleh kerapatan elektron yang dihitung dengan fase tertentu, dengan jumlahn Monomer 17.350 dalton dengan bentuk lembaran sandwich beta-lipid antiparalel yang memanjang. TNF- α sendiri memiliki topologi "jelly-roll" dengan tiga monomer yang berasosiasi erat pada sumbu simetri dengan lipatan sejumlah 3 lipatan untuk membentuk struktur trimer berbentuk lonceng yang rigid.

2.1.2 Bentuk Sekresi dan Fungsi Biologis TNF-Alpha

Secara biologis aktifitas TNF- α dalam bentuk trans-membran TNF- α (pro-TNF), namun demikian TNF- α dalam mengarahkan fungsi autokrin dan parakrin berbentuk struktur trimerik yang larut dalam perkembangan biologisnya. Kehadiran TNF- α dalam fungsi biologis bertindak sebagai faktor pertumbuhan autokrin dan parakrin yang merangsang proliferasi sel hematopoietik dan sel B.²¹ Secara aktifitas sensor TNF- α transmembran yang berada di permukaan sel penghasil TNF- α akan mengikat reseptor TNF pada sel target; untuk lebih lanjut akan menjalankan berbagai fungsi biologis; dimana dalam proses tersebut akan berkontribusi pada modulasi peradangan lokal berupa kontak antarsel dan juga spesifik terhadap jenis sel tertentu.



Gambar 2.2. Skema Aktifitas Biologis TNF- α dengan reseptornya²⁰

Pada Gambar 2.2. ditunjukkan sekmatik bagaimana TNF- α terdapat aktifitas menghambat pembaruan diri sel induk embrionik serta mendorong

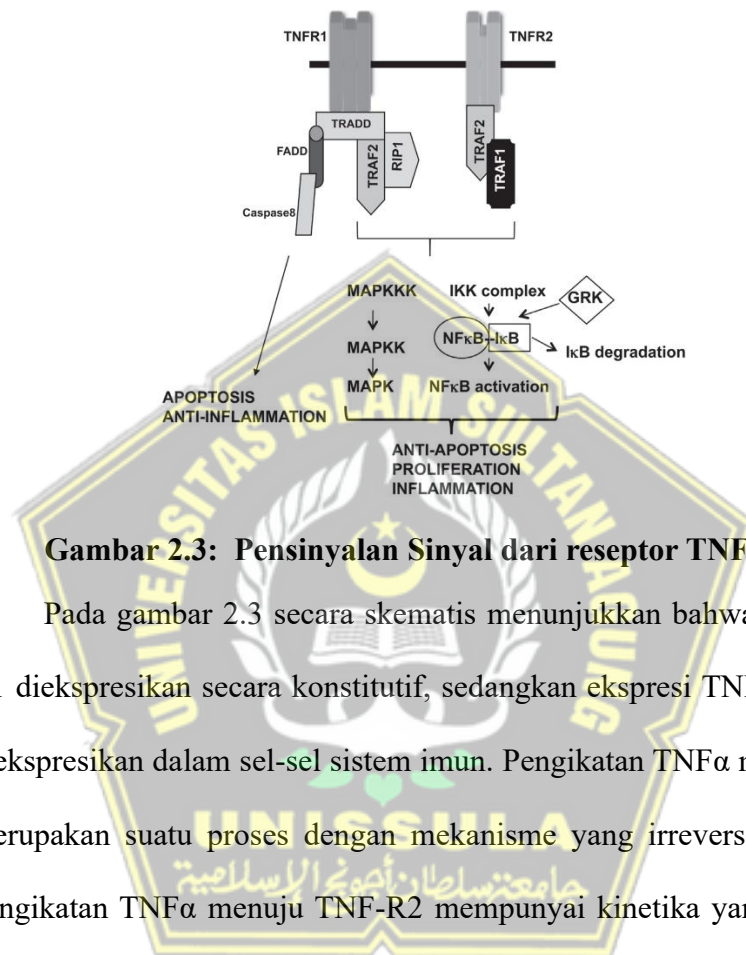
adanya aktifitas migrasi sel, yang dalam hal ini juga menghambat diferensiasi sel progenitor sehingga mendorong terjadinya proliferasi dan kelangsungan hidup sel. Lebih lanjut, dalam aktifitas biologisnya $\text{TNF-}\alpha$ juga akan bekerja pada sel yang mensekresikannya dalam bentuk sinyal autokrin atau sel di sekitarnya dalam bentuk sinyal parakrin. Dalam aktifitas yang lebih tinggi $\text{TNF-}\alpha$ mendorong terjadinya proses proliferasi sel pada konsentrasi rendah dan menghambat terjadinya proliferasi sel, disamping itu $\text{TNF-}\alpha$ juga akan menginduksi adanya apoptosis pada konsentrasi tinggi.

2.1.3 Ekspresi $\text{TNF-}\alpha$

Didalam tubuh $\text{TNF-}\alpha$ diproduksi sebagai bentuk respons terhadap berbagai rangsangan oleh berbagai jenis sel yang berlangsung secara cepat. Diantara jenis sel yang mengekspresikan $\text{TNF-}\alpha$ meliputi sel T, Sel B, Makrofag, sel dendritik hingga fibroblast.²⁴ Dimana bentuk dari rangsangan tersebut yang akan mengaktifasi gen TNF yang meliputi zat patogen, sitokin dari sel imun yang lainnya, dan stresor lingkungan.

Ekspresi gen $\text{TNF-}\alpha$ secara regulasi diatur oleh daerah promotor proksimal yang terdiri dari sekitar 200 pasangan basa,²⁴ dimana dalam pasangan basa tersebut sebagian besar letak pengikatan terjadi di daerah promotor proksimal dengan kemampuan mengenali beberapa faktor transkripsi, sehingga memungkinkan TNF diaktifasi oleh berbagai jalur pensinyalan pada aktifitas biologis. Ekspresi gen $\text{TNF-}\alpha$ itu sendiri juga diatur oleh struktur DNA, ketika terjadi aktifitas tersebut yang terjadi adalah struktur DNA melingkari histon; yang dilonggarkan melalui asetilasi dan

dipadatkan melalui proses metilasi; dimana struktur protein yang mengasetilasi histon pada promotor TNF, khususnya protein pengikat CREB pada sel T akan berperan penting ketika terjadi ekspresi TNF- α .



Gambar 2.3: Pensinyalan Sinyal dari reseptor TNF- α ²⁵

Pada gambar 2.3 secara skematis menunjukkan bahwa reseptor TNF-R1 diekspresikan secara konstitutif, sedangkan ekspresi TNF-R2 diatur dan diekspresikan dalam sel-sel sistem imun. Pengikatan TNF α menuju TNF-R1 merupakan suatu proses dengan mekanisme yang irreversibel, sedangkan pengikatan TNF α menuju TNF-R2 mempunyai kinetika yang bersifat aktif dan nonaktif pada selang waktu yang sangat cepat. Pada proses pensinyalan kedua reseptor dapat dibelah dari permukaan sel oleh enzim metalloproteinase sebagai respons terhadap sinyal inflamasi. Oleh sebab itu disarankan bahwa TNF-R2 dimungkinkan bertindak sebagai penghantar ligan ke TNF-R1 yang bertugas untuk meningkatkan konsentrasi lokal TNF α di permukaan sel melalui pengikatan dan disosiasi ligan.²⁵

2.1.4 Faktor yang mempengaruhi kadar TNF-Alpha

Beberapa faktor yang mempengaruhi kadar TNF-Alpha, antara lain^{17,26}:

1. Usia

Seiring bertambahnya usia manusia, akan berdampak kepada sel-sel dalam tubuh akan semakin menua. Penuaan dikaitkan dengan peningkatan aktivitas inflamasi dalam darah; dapat menyebabkan berbagai penyakit degenerative; yang erat kaitannya dengan *senescence-associated secretory phenotype* (SASP). SASP dapat memicu aktivasi dan proliferasi sel progenitor sehingga terjadi peningkatan kadar sirkulasi dan sekresi TNF- α .

2. Inflamasi.

Respon inflamasi dapat mengaktifkan berbagai faktor genotip yang ada didalam metabolisme, hal ini merupakan respon enzimatik yang salah satunya adalah TNF- α .

3. Penyakit degeneratif, yang didalamnya termasuk metabolic syndrome dan DM Type-2, dan beberapa jenis penyakit lainnya.

2.1.5 Metode Pemeriksaan Kadar TNF-Alpha

Terdapat berbagai metode pemeriksaan kadar TNF- α , antara lain^{27,28,29}:

1. Pengukuran Menggunakan ELISA

Salah satu metoda yang digunakan sebagai dasar pemeriksaan kadar TNF- α yang paling sering digunakan metoda ELISA. Dalam metoda pemeriksaan ini cukup mudah, karena hanya membutuhkan sampel darah dari hewan coba untuk kemudian dilakukan sentrifugasi agar

didapatkan *Platelet-Rich Plasma* (PRP), specimen PRP inilah nanti yang akan digunakan untuk mengetahui kadar TNF- α .

2. *Western Blotting*

Metoda ini metoda paling sering digunakan dengan cara mengetahui ukuran protein penyusun yang ada didalam suatu sampel darah. Pada metoda ini protein dipisahkan menurut ukurannya dengan gel elektroforesis yang kemudian dipindahkan ke membrane tertentu. Antibodi yang spesifik terhadap TNF- α digunakan untuk mendeteksi protein penyusun sampel untuk dianalisa berdasarkan ukuran dan kadar proteinnya.

3. *Radioimmunoassay*

Pengukuran menggunakan Radioimmunoassay merupakan metoda menggunakan suatu radioaktif, pada metode ini digunakan suatu isotop radioaktif untuk mendeteksi dan mengukur TNF- α , dari pengukuran tersebut hubungan ligan radioaktif ke protein penyusun TNF- α dapat ditentukan kadar dan jumlahnya.

4. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*

Metoda ini digunakan untuk mengetahui suatu kadar sampel tertentu, sampel dipisahkan berdasarkan ukuran dan muatannya dengan gel elektroforesis atau kromatografi cair, kemudian protein diidentifikasi dan diukur secara terpisah dengan spektrometri massa. Chromatogram yang dihasilkan akan menunjukkan prosentase dari kadar dari masing-masing penyusun specimen sampel.

2.2 IL-1

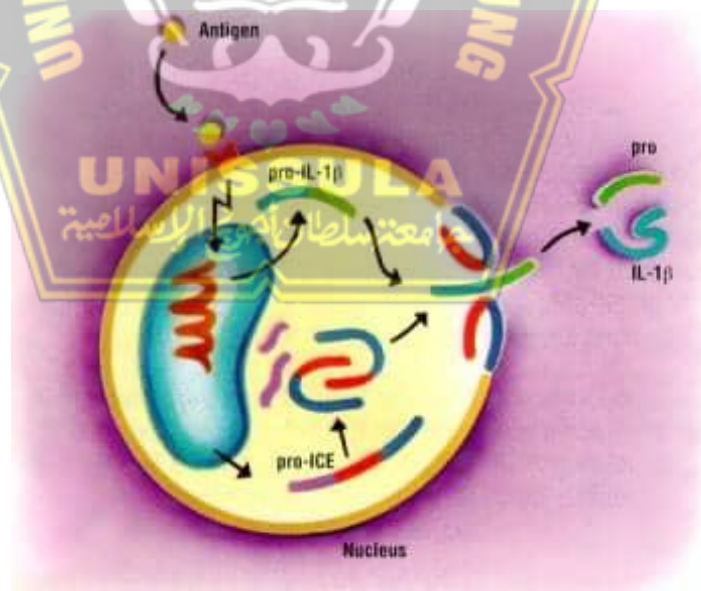
Interleukin-1, merupakan suatu sitokin inflamasi, keberadaannya memiliki beragam fungsi fisiologis dan signifikansi patologis serta berperan penting dalam kesehatan dan penyakit. IL-1 merupakan pengatur utama dalam suatu inflamasi melalui jalur pengendalian berbagai proses imun bawaan,³⁰ ilmu kesehatan memandang kehadiran IL-1 sebagai suatu sitokin yang memiliki berbagai fungsi biologis, yang termasuk bertindak sebagai pirogen leukosit, sebuah mediator kondisi demam dan mediator endogen leukosit, serta merupakan penginduksi beberapa komponen respon fase akut dan faktor pengaktif limfosit (LAF).³¹ Apabila diperbandingkan dengan kelompok sitokin inflamasi lainnya, struktur ligan IL-1 dan reseptor IL-1 lebih berasosiasi pada kondisi inflamasi akut dan kronis; jaringan lapisan sitosol yang ada pada setiap reseptor IL-1 berisikan domain reseptor Toll-IL-1; yang mana domain tersebut juga terdapat pada setiap reseptor mirip Toll yang berperan sebagai reseptor dalam respon atas produk mikroba dan virus.³²

2.2.1 Peran *Interleukin-1* (IL-1) dalam Inflamasi

Interleukin-1 didalam tubuh hadir sebagai mediator respon inflamasi penjamu pada imunitas non-spesifik. Sebagai salah satu sitokin pro-inflamasi IL-1 yang terletak di Makrofag yang diekspresikan oleh banyak sel dan memiliki banyak fungsi termasuk dalam inflamasi lokal. IL-1 juga dikenal dengan sejumlah nama alternatif, termasuk faktor pengaktif limfosit, pirogen endogen, katabolin, hemopoietin-1, faktor penghambat

pertumbuhan melanoma, dan faktor pengaktif osteoklas. Sifat dan aktivitas biologis IL-1 telah ditinjau secara ekstensif.

Dalam konteks inflamasi terdapat sel-sel yang diketahui mengekspresikan IL-1a meliputi astrosit, fibroblas, hepatosit, keratinosit, sel T dan eosinofil, sel dendritik, monosit, dan oligodendrosit. Sedangkan pada IL-1b dalam ekspresinya melibatkan astrosit, sel korteks adrenal, sel NK, makrofag dan monosit, sel endotel, keratinosit, megakariosit, neuron, neutrofil, oligodendroglia, osteoblas, sel Schwann, trofoblas, dan sel T plus fibroblas. Setelah ligasi bakteri atau imunoglobulin monosit/makrofag CD14 (reseptor LPS) atau CD64 (reseptor IgG), sedangkan IL-1 dapat dilepaskan ke lingkungan lokal.³³

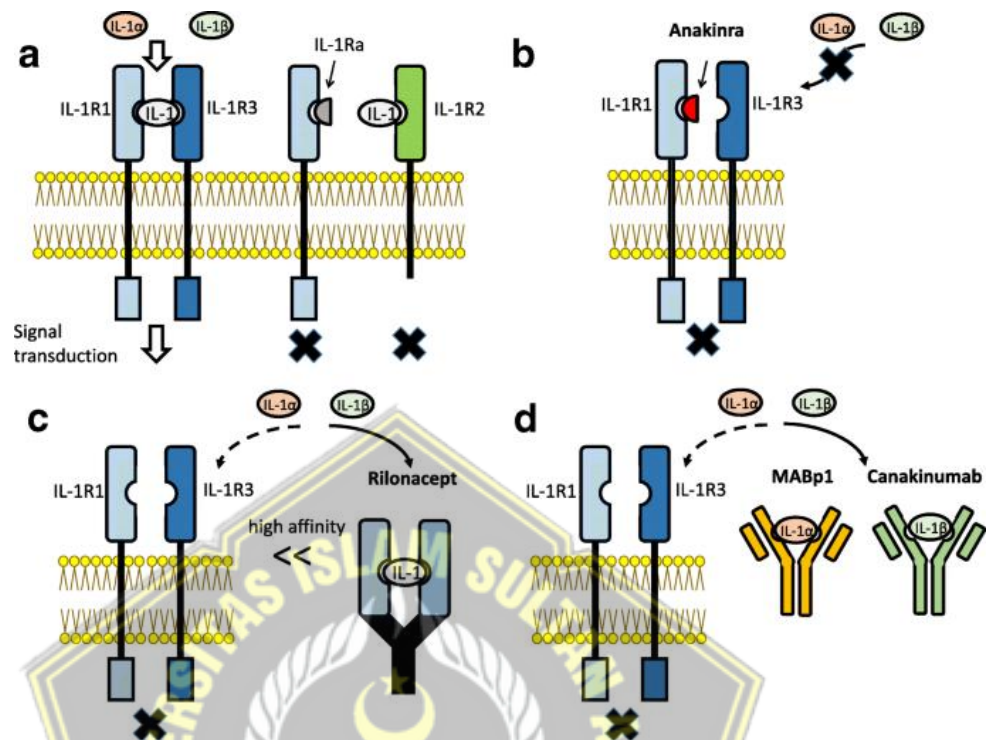


Gambar 2.3. Skematis IL-1³³

Konsep mengenai sistem imun menyatakan bahwa produksi IL-1 biasanya diinduksi yang berakibat pada inflamasi. Namun demikian, efek IL-1 tidak terbatas pada inflamasi, hal ini karena IL-1 juga berkaitan dengan pembentukan dan perombakan tulang, sekresi insulin, serta pengaturan induksi demam, serta perkembangan fenotipe neuronal, dan fisiologi IGF/GH.

2.2.2 Mekanisme kerja molekuler *Interleukin-1*

Interleukin-1 diaktivasi melalui mekanisme molekular yang cukup rumit, IL-1 sendiri sebagaimana diketahui merupakan suatu sitokin inflamasi, bentuk homolog dari IL-1 dapat berupa IL-1 α dan IL-1 β yang diisolasi dari dua cDNA yang berbeda, namun demikian diantara dua homolog tersebut tidak dapat dibedakan dalam hal fungsi biologisnya.³³ Besaran jumlah homolog IL-1 baik homolog IL-1 α dan IL-1 β tidak tinggi dalam hal urutan asam amino; hanya sejumlah 27%; homolog IL-1 α dan IL-1 β secara struktural serupa dan menunjukkan fungsi yang sama dengan berbagi reseptor yang sama, reseptor IL-1 tipe 1 (IL-1R1), dan keduanya memiliki β -barrel sentral yang sama beserta loop yang berdampingan.



Gambar 2.3. Pensinyalan Reseptor dan Inhibitor IL-1³²

Secara spesifik pada alur skematis pensinyalan menunjukkan bahwa IL-1R1 berinteraksi dengan IL-1 α dan IL-1 β dan mendorong adanya transduksi sinyal bersama dengan koreseptornya IL-1R3 (IL-1RAcP). Kehadiran IL-1Ra sendiri merupakan protein yang spesifik mengikat IL-1R1 namun tidak mengikat IL-1R3, dalam hal ini berfungsi sebagai penghambat sinyal IL-1. Sedangkan IL-1R2 hadir sebagai reseptor umpan karena tidak memiliki segmen sitoplasma. Selanjutnya dalam proses pensinyalan dilanjutkan oleh anakinra, yang merupakan bentuk rekombinan IL-1Ra intrinsik yang ada pada manusia, peranan anakinra bekerja memblokir kehadiran IL-1R1, dan mampu menghambat IL-1 α dan

IL-1 β menempel pada substrat. Protein lain yang juga memberikan peran pensinyalan inflamasi IL-1 adalah Rilonacept; merupakan protein rekombinan yang mencakup protein ekstraseluler IL-1R1 dan IL-1R3 pada manusia yang menyatu dan bagian dari IgG-1. Secara fungsional Rilonacept akan mengikat IL-1 α dan IL-1 β dengan afinitas tinggi, pada tahapan lanjut, muncul Canakinumab dan MABp1 yang merupakan antibodi monoklonal terhadap IL-1 β dan IL-1 α , kedua berperan sebagai reseptor yang mengikat dan menetralkan target mereka secara spesifik.

2.2.3 Faktor-Faktor yang mempengaruhi IL-1

Beberapa factor yang dapat mempengaruhi kadar IL-1, antara lain^{35,36}:

1. Usia.

Semakin bertambah usia pada individu secara signifikan juga akan terjadi penuaan sel, hal ini juga berimplikasi pada penurunan kemampuan imun dan disfungsi organ pada individu tersebut.

2. Kondisi Gizi Individu

Apabila kurang nutrisi, akan terjadi imunosupresi sehingga kemungkinan terjadinya infeksi akan meningkat, sedangkan jika kelebihan gizi akan meningkatkan risiko penyakit metabolik dan kardiovaskuler, menyebabkan gangguan imunitas protektif.

3. Terdapatnya kondisi infeksi, dalam hal ini IL-1 juga akan diproduksi oleh berbagai sel imun jika terjadi infeksi virus, bakteri, fungi, protozoa.

4. Penyakit Autoimun pada Individu, adanya penyakit autoimun seperti penyakit *autoimmune encephalomyelitis* (EAE) tentunya akan berdampak kepada kondisi IL-1 selaku sitokin inflamasi.
5. Penyakit Neurodegenerative, seperti penyakit Alzheimer, Parkinson, memiliki potensi tinggi atas pengaruhnya kepada IL-1, hal ini tentunya akan berdampak juga kepada kualitas dan kuantitas IL-1.
6. Penggunaan Obat Kimia Sintesis, penggunaan obat-obatan sintesis akan mempengaruhi respon metabolik, hingga respon imun yang memang berada dibawah regulasi IL-1, jenis obat-obatan yang dapat berpengaruh ini seperti obat-obatan golongan glukokortikoid

2.2.4. Metode Pemeriksaan IL-1

Metode pemeriksaan interleukin-1, antara lain^{37,38,39} :

1. Metode ELISA. Metode ini memiliki spesifisitas yang tinggi untuk mendeteksi IL-1 spesifik, keuntungan digunakannya metoda ELISA Hemat biaya, Throughput tinggi, serta Pemantauan produksi sitokin kumulatif sepanjang periode kultur
2. Metode Bioassay. Metode ini umumnya digunakan untuk mengukur aktifitas fungsional dari IL-1 sebagai kemampuannya untuk menghambat produksi sitokin pro-inflamasi
3. Metode *Cytometric Bead Array* (CBA). Metode ini sebenarnya memiliki kemiripan dengan metoda ELISA, hanya saja dalam hal ini membutuhkan lebih sedikit sampel dan waktu pengujian lebih singkat.

Metode ini juga dapat mengukur berbagai parameter, seperti kemokin, mediator inflamasi, molekul adhesi, mediator apoptosis dan antibody.

2.3. Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lam.)

2.4.3. Definisi

Tumbuhan kelor dengan nama Latin *Moringa oleifera* Lam. Telah banyak dikenal sebagai sejenis tanaman obat lokal, yang berasal dari India dan sudah tidak asing lagi di negara tropis dan subtropics, di berbagai wilayah di Indonesia, disebut dengan berbagai nama diantaranya adalah kelor (Jawa, Sunda, Bali, Lampung), maronggi (Madura), moltong (Flores), kelo (Bugis), onge (Bima), murong atau barungai (Sumatera) dan hau fo (Timur).⁴⁰ Diluar negeri, banyak budidaya kelor, karena kelor termasuk tanaman yang mudah adaptasi dengan lingkungan dan dikenal memiliki banyak manfaat. Daun kelor secara fitokimia mengandung senyawa golongan flavonoid dan polifenol yang memiliki sifat antioksidan dan antiinflamasi. Antioksidan ini membantu melindungi tubuh dari radikal bebas berbahaya, yang dapat menyebabkan stres oksidatif dan kerusakan sel.



Gambar 2.3. Daun Kelor dan Serbuk Daunnya⁴⁰

Daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) secara taksonomi diklasifikasikan sebagai berikut⁴⁰:

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Sub Kingdom	: <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> Lam.

Hasil Analisa profil senyawa biologis yang dilakukan peneliti terdahulu mengatakan bahwa kandungan Daun Kelor (*Moringa olerifera* Lam.) meliputi serat, vitamin, flavonoid, phenolic acid, polyphenol, phenol. Flavonoid yang terkandung dalam daun kelor, yaitu *Rutin*, *Kaempferol*, *Quercetin*, *Myercetin*, dan *Isorhamnetin*, yang dilaporkan memiliki efek anti-inflamasi.^{5,41}

2.4.4. Kandungan Zat Aktif Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lam.)

Daun kelor berdasarkan kajian fitokimia disebutkan banyak mengandung zat aktif seperti flavonoid, alkaloid, polifenol dan saponin yang memiliki potensi sebagai antioksidan.⁵² Kandungan lain yang juga terdapat didalam ekstrak daun kelor berupa protein, asam amino, lemak, dan minyak.⁵³ Kandungan zat aktif daun kelor secara keseluruhan dapat dikonfirmasi melalui beberapa metoda, qualitative dan quantitative. Kandungan zat aktif pada ekstrak daun kelor secara kualitatif dikonfirmasi melalui uji kualitatif terhadap masing-masing gugus zat aktif, semisal untuk mengkonfirmasi kehadiran flavonoid digunakan uji FeCl_3 , untuk uji fenol digunakan reagen Folin-ciocalteu,⁵³ keduanya secara kualitatif hanya akan mengkonfirmasi melalui pengamatan fisik. Metoda quantitative dalam penentuan kandungan, digunakan *Gas Chromatography-Mass Spectrofotometry* (GC-MS) atau *High Perfomance Liquid Chromatography* (HPLC) dalam bentuk kromatogram dan persentase kandungan didalamnya.

2.4.5. Manfaat Daun Kelor (*Moringa oleifer lam*)

Profil kandungan nutrisi yang luar biasa, serta khasiat yang baik untuk kesehatan, daun kelor (*Moringa oleifera*) diyakini sebagai suatu tanaman yang merupakan tambahan yang berharga untuk gaya hidup sehat. Seiring dengan penelitian yang terus berkembang, tumbuhan yang luar biasa ini mungkin menyimpan lebih banyak rahasia untuk meningkatkan kesehatan dan kesejahteraan manusia. Penggunaan daun kelor (*Moringa*

oleifera Lam.) dalam pengobatan tradisional telah mendorong para peneliti untuk menjelaskan aktivitas farmakologi ekstrak dari daun kelor. Beberapa penelitian membuktikan bahwa dari daun kelor memiliki efek farmakologi yaitu sebagai antimicrobial, antifungal, anti-inflamasi, antioksidan, antikanker, fertilitas, dan lain-lain.^{41,42}

2.4. Hiperlipidemia

Hiperlipidemia merupakan suatu kondisi yang mencakup berbagai kelainan genetic, diilustrasikan sebagai suatu kondisi yang menggambarkan peningkatan kadar lipid dalam tubuh manusia, Indikator yang nampak adalah terjadinya kenaikan kadar LDL (*Low Density Lipoprotein*), kadar trigliserid, dan kolesterol total, serta rendahnya angka HDL (*High Density Lipoprotein*).^{2,3} Berbagai macam factor dapat memicu kondisi hiperlipidemia ini, salah satunya pola hidup yang tidak baik dan memiliki kecenderungan *sedentary*, diabetes tidak terkontrol, hipotiroid, konsumsi obat-obatan (amiodaron, glukokortikoid), dan genetik.^{3,4} Hiperlipidemia sendiri dapat menjadi factor risiko penyakit dengan angka mortalitas tinggi, seperti halnya serangan jantung, stroke, penyakit jantung iskemik dan stroke.⁴ Penatalaksanaan penyakit hiperlipidemia itu sendiri umumnya akan disarankan untuk mengubah pola hidup, olahraga rutin yang sesuai agar lebih bugar, namun pada tahapan yang lebih lanjut akan disarankan pemberian obat golongan statin,³ umumnya digunakan simvastatin dan atorvastatin.

2.4.1. Diet Tinggi Lemak

Diet Tinggi Lemak atau dikenal dengan HFD (Hight Fatty Diet) merupakan suatu induksi pada hewan coba dengan diet yang terdiri dari minimal 35% kebutuhan kalorinya bersumber dari lemak, baik tak jenuh maupun jenuh.⁶¹ Diet Tinggi lemak sendiri pada hewan coba umumnya diberikan pakan jadi hasil olahan, namun demikian untuk menyokong kebutuhan biasanya disuplai juga menggunakan lemak hewani, mentega, hingga minyak ikan. Diet Tinggi lemak telah banyak digunakan untuk melihat dampak pertumbuhan, khususnya pada hewan coba tikus.⁶¹ Pengaruh diet tinggi lemak sendiri bersifat berbeda-beda, dengan memiliki ketergantungan pada masing-masing galur dan jenis tikus yang digunakan dalam penelitian. Pada beberapa penelitian yang dilaporkan, diet tinggi lemak juga digunakan dan memberikan dampak kepada analisis patofisiologi resistensi insulin pada tikus.⁶²

2.4.2. Faktor yang Mempengaruhi Hiperlipidemia

Beberapa faktor yang mempengaruhi Hiperlipidemia, antara lain^{2,3} :

1. Bertambahnya Usia, dengan adanya penambahan usia hal ini sejalan dengan peningkatan angka kejadian hiperlipidemia.
2. Pola Hidup, dengan banyaknya pola hidup yang *sedentary* dan juga mengkonsumsi makanan cepat saji, kurangnya kebiasaan pola hidup sehat akan mempengaruhi kadar kolesterol dalam darah.
3. Peningkatan Stres, kondisi psikologis yang stress akan banyak mempengaruhi kadar lipid, peningkatan kondisi stress psikologis,

berdampak juga kepada semakin meningkatnya kadar lipid. Hal ini juga berlaku sebaliknya ketika terjadi aktifitas fisik berlebih, yang menyebabkan stres fisik, yang berimplikasi pada stress psikologis.

4. Faktor genetic, genetika memiliki pengaruh penting dalam mempengaruhi kondisi hiperlipidemia, faktor bawaan keturunan genetik dengan kondisi hiperlipidemiaa akan terwariskan gen-gen dari orang tua yang mengidap hiperlipidemiaa.

2.5. Pengaruh Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lam.) terhadap Kadar TNF- α dan IL-1 pada Tikus Hiperlipidemia

Induksi makanan dengan diet tinggi lemak diduga akan menyebabkan penumpukan lemak pada hepar dan perut, terutama jaringan adiposite, serta menyebabkan perubahan ekspresi gen yang berhubungan dengan metabolisme lipid di hati, pada kondisi ini overexpression dimungkinkan terjadi pada TLR-2, TLR-4, NF-kb, TNF-alfa dan IL-6, serta terjadi penurunan kadar IL-1.⁴³ Gangguan metabolisme lipid dapat mempengaruhi NADPH oxidase untuk merangsang sel endotel memproduksi ROS (*Reactive Oxygen Species*).⁴⁴

Kenaikan kadar ROS yang tinggi menyebabkan inflamasi dan awal perkembangan dari banyak penyakit inflamasi. Molekul ROS juga sebagai *signaling molecule* yang meregulasi pertumbuhan sel, adhesi sel terhadap sel lainnya, diferensiasi, penuaan dan apoptosis. ROS dapat menghambat atau menstimulasi persinyalan NF- κ B.⁴⁴ Kehadiran NF- κ B memiliki pengaruh penting sebagai respon inflamasi terhadap pathogen dan sel kanker; dalam hal

ini NF- κ B berperan terhadap imunitas yang jalurnya tidak berbeda dengan peran makrofag, pada jalur metabolismenya faktor transkripsi NF- κ B juga meregulasi ekspresi gen yang berpengaruh dalam regulasi pertumbuhan sel, diferensiasi, pembentukan dan apoptosis.⁴⁵ Dampak dari kehadiran NF- κ B itu sendiri akan menginduksi berbagai ekspresi gen pro-inflamasi, termasuk sitokin dan kemokin.⁴⁶ Organel yang tak kalah penting pada proses inflamasi adalah Makrofag, kehadiran Makrofag mensekresi berbagai sitokin dan dapat terjadi suatu polarisasi; sering dikenal dengan M1 atau M2; dimana M1 memproduksi sitokin pro-inflamasi, seperti gen IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α , dan kemokin yang berhubungan dengan proses inflamasi. Polarisasi M1 ini juga akan menjadikan adanya diferensiasi sel T-inflamasi, termasuk Th1 dan Th17 yang akan menjadi mediator inflamasi.⁴⁶

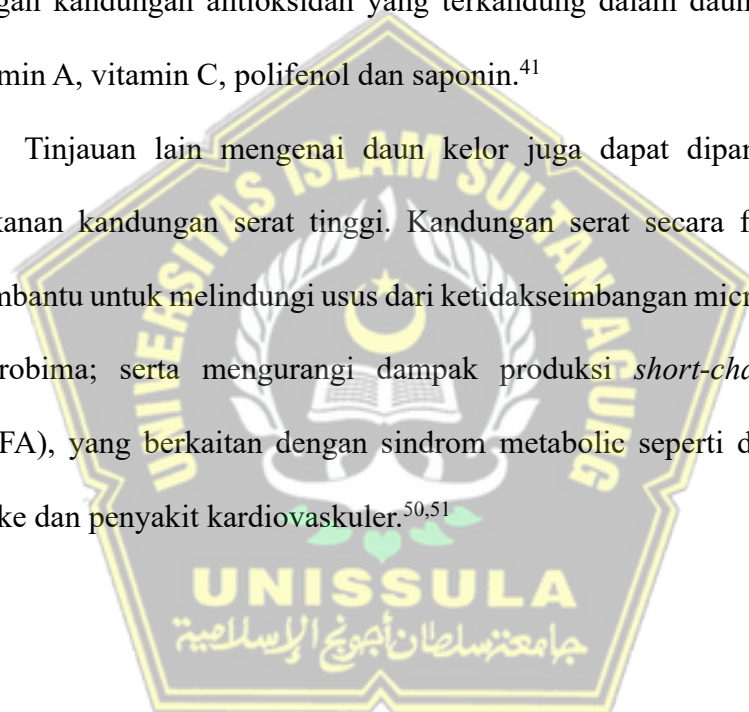
Pada polarisasi yang lain, polarisasi M2 terjadi suatu produksi sitokin anti-inflamasi, seperti gen IL-10 dan IL-13, dalam hal ini keduanya mempunyai peran penting dalam menghentikan inflamasi serta menginisiasi penyembuhan luka,⁴⁶ polarisasi M2 yang semakin bagus maka akan menjadikan penyembuhan luka lebih cepat dan inflamasi dapat dihentikan.

Asupan makanan yang diterima oleh usus akan berpengaruh terhadap struktur dan fungsi kultur biologis mikrobioma usus.⁴⁷ Ketika dilakukan diet tinggi lemak tentunya akan memberikan dampak pada keseimbangan mikrobioma usus, dampak lainnya akan menyebabkan terganggunya metabolisme lipid, sehingga dapat memperparah kondisi hiperlipidemia.⁴⁸ Peningkatan pembentukan ROS akibat hiperlipidemia juga akan menyebabkan

disbiosis mikroba usus, apabila terdapat paparan jangka panjang ROS akan menyebabkan berbagai jenis penyakit usus, seperti dysbiosis microbiota, luka saluran cerna, kanker kolorektal, infeksi enteric, dan *inflammatory bowel disease*.⁴⁹

Sebagaimana telah banyak diketahui bahwa daun kelor memiliki banyak kandungan zat aktif, antara lain vitamin dan antioksidan, serta asam amino, dengan kandungan antioksidan yang terkandung dalam daun kelor meliputi vitamin A, vitamin C, polifenol dan saponin.⁴¹

Tinjauan lain mengenai daun kelor juga dapat dipandang sebagai makanan kandungan serat tinggi. Kandungan serat secara fungsional akan membantu untuk melindungi usus dari ketidakseimbangan microbiota; dampak mikrobima; serta mengurangi dampak produksi *short-chain fatty acids* (SCFA), yang berkaitan dengan sindrom metabolic seperti diabetes, kanker stroke dan penyakit kardiovaskuler.^{50,51}



BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

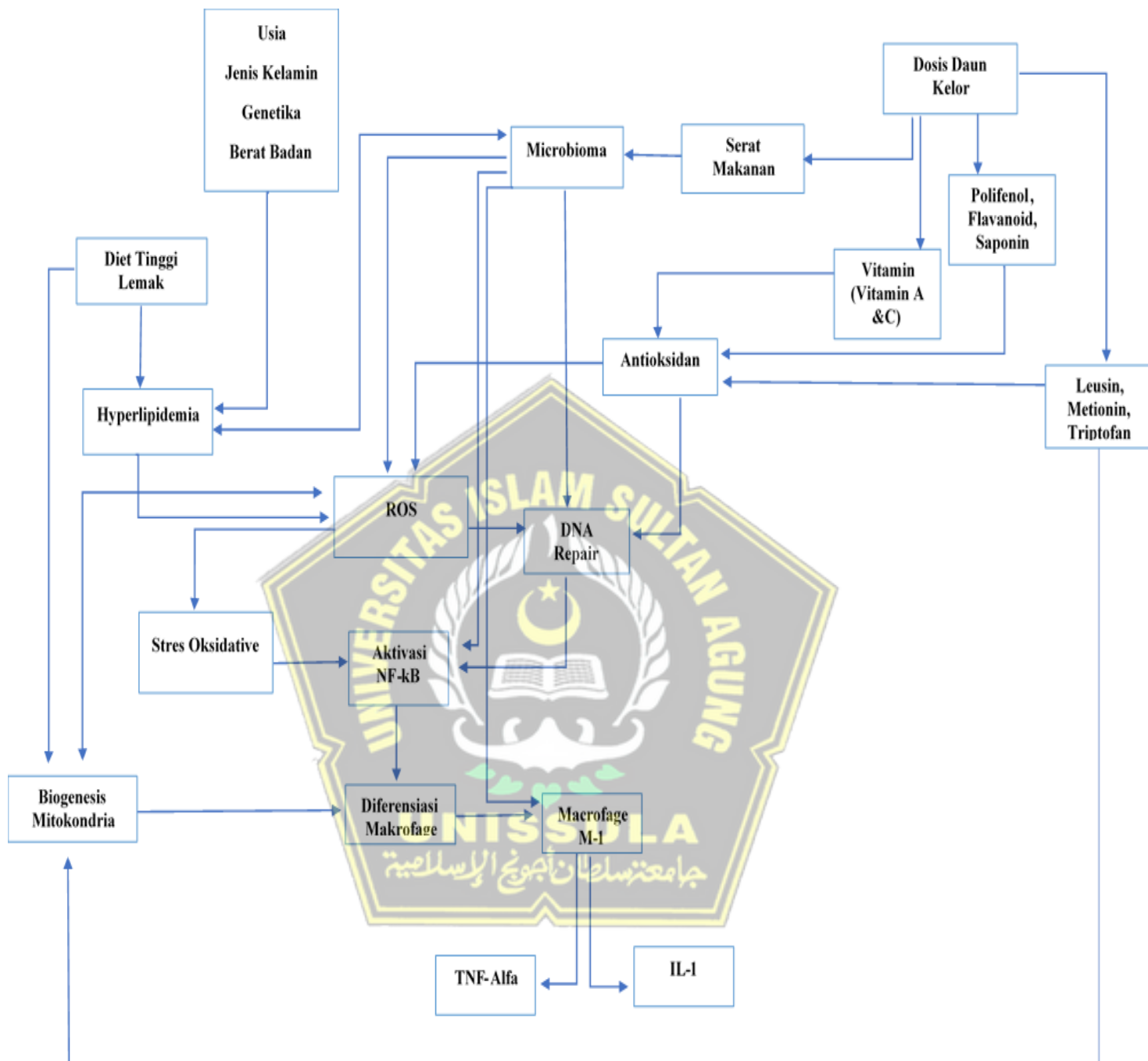
3.1. Kerangka Teori

Diet tinggi lemak dapat menyebabkan peningkatan kadar lipid didalam darah, sehingga memicu keadaan hiperlipidemia⁴⁶ dan menjadikan terganggunya microbioma usus serta terpengaruhinya proses biogenesis yang terjadi di mitokondria. Selain diet tinggi lemak, hiperlipidemia juga dipengaruhi oleh usia, gender, genetik, dan status gizi.^{43,44} Keadaan hiperlipidemia akan memicu naiknya kadar ROS dan berakibat pada keadaan stress oksidatif, sehingga dapat menyebabkan disfungsi sel endotel dan menyebabkan aterosklerosis.⁴⁷ Stres oksidatif akibat kadar ROS yang tinggi juga akan mengaktifkan kaskade NF- κ B yang menginduksi terjadinya diferensiasi dan polarisasi makrofag(Mo) menjadi M1 dan M2,^{47,48} hal lain yang mempengaruhi polarisasi makrofag juga disebabkan adanya gangguan biogenesis di mitokondria. Makrofag (M0) yang terdiferensiasi dan terpolarisasi menjadi M1 menginduksi aktivasi sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α atau IL-1, sedangkan polarisasi di makrofag M2 menginduksi sekresi sitokin anti-inflamasi seperti IL-4, IL-10 dan IL-3.^{48,49}

Adanya pemberian sejumlah dosis daun kelor yang mengandung serat tinggi, vitamin A, vitamin C, polifenol, flavonoid dan saponin, serta beberapa asam amino ; leusin, iso leusin, metionin, triptofan; Pada penelitian terdahulu menyatakan bahwa kehadiran serat tinggi pada makanan terbukti mempengaruhi microbiota usus, serta bermanfaat untuk berbagai macam penyakit kronik dan kompleks, seperti obesitas, diabetes, kanker dan penyakit

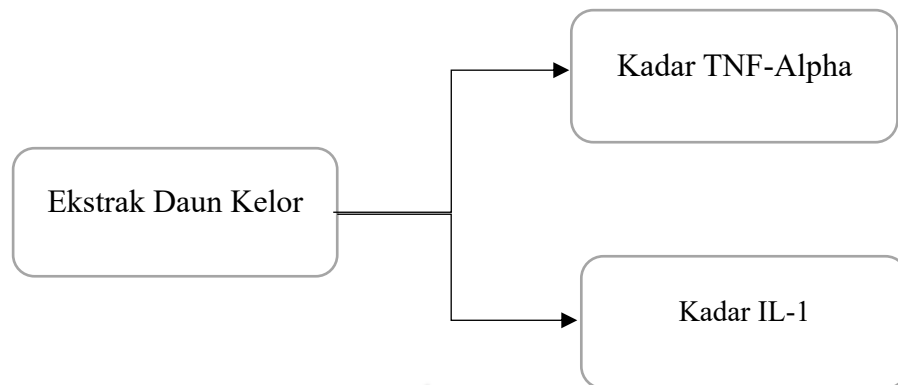
kardiovaskuler.^{41,46} Selain itu terdapatnya kandungan asam amino ; leusin, isoleusin, metionin, triptofan; Asam amino tersebut merupakan pendorong utama identitas seluler yang memengaruhi perkembangan, polarisasi fungsional terhadap fenotipe inflamasi,⁵⁴ dengan cara mempengaruhi biogenesis energi di mitokondria, kandungan asam amino akan mengaktifasi perbaikan makrofage (M0) dan akan mengompensasi kerusakan yang terjadi di makrofag(M0).





Gambar 3.1. Kerangka Teori

3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis Penelitian

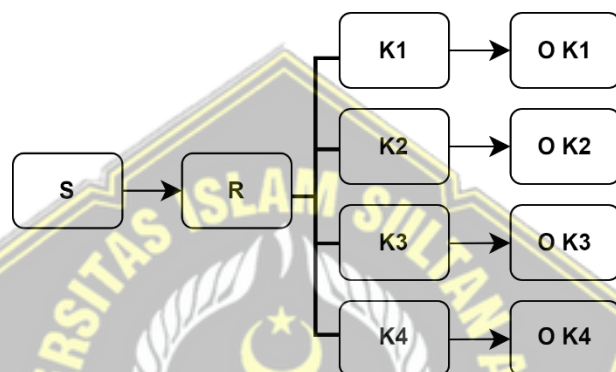
Pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) dengan dosis 400mg/kgBB/hari dan 800mg/kgBB/hari berpengaruh terhadap kadar TNF- α dan IL-1 pada keadaan Hiperlipidemia untuk tikus *Sprague dawley*.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

- Jenis penelitian: Eksperimental
- Rancangan Penelitian: *post-test only control group design*



Gambar 4.1. Skema Rancangan Penelitian

Keterangan:

- S : Subjek penelitian
- R : Randomisasi alokasi menjadi 4 kelompok
- K1 : Kelompok kontrol negatif yang diinduksi diet tinggi lemak
- K2 : Kelompok kontrol positif yang diinduksi diet tinggi lemak dan diberi obat Standar (atorvastatin 5mg/kgBB)
- K3 : Kelompok perlakuan 1 yang diinduksi diet tinggi lemak dan diberi ekstrak daun kelor 400mg/kgBB/hari
- K4 : Kelompok perlakuan 2 yang diinduksi diet tinggi lemak dan diberi ekstrak daun kelor 800mg/kgBB/ hari

4.2. Populasi dan Teknik Pengambilan Sampel

4.2.1. Populasi dan Sampel

Populasi pada penelitian ini berupa sejumlah tikus jantan galur *Sprague dawley* yang memenuhi kriteria inklusi dengan sudah diadaptasi

pada kondisi lingkungan laboratorium, di Laboratorium IBL Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

4.2.2. Besar Sampel

Menurut WHO besaran sampel untuk setiap kelompok minimal 5 ekor dengan cadangan 10% (1 ekor) untuk menghindari *loss of follow*. Sampel perlu dirandomisasi menggunakan cara *simple random sampling*, dibagi menjadi 4 kelompok dengan pembagian kelompok : 1 kelompok kontrol negatif, 1 kelompok kontrol positif dan 2 kelompok perlakuan. Jumlah keseluruhan sampel tikus *Sprague Dawley* jantan yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 24 ekor.⁵⁷

4.2.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian

Teknik pengambilan sampel penelitian ini menggunakan cara *simple random sampling*. Tikus Jantan galur *Sprague dawley* sebanyak 24 ekor yang masuk kriteria inklusi dibagi menjadi 4 kelompok secara acak sederhana, dengan 1 kelompok kontrol positif, 1 kelompok kontrol negatif dan 2 kelompok perlakuan.

4.2.4. Kriteria Inklusi

1. Tikus dalam keadaan aktif, sehat, dan aktifitas normal
2. Umur 2,5-3 bulan
3. Berat badan 200-250 gram

4.2.5. Kriteria Eksklusi

1. Tikus yang tidak menjadi hiperlipidemia setelah diinduksi diet tinggi lemak

4.2.6. Drop Out

1. Tikus mati saat penelitian berlangsung

4.3. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.3.1. Variabel

- a. Variabel bebas : Dosis ekstrak *Moringa oleifera*
- b. Variabel terikat : Kadar TNF- α dan IL-1
- c. Variabel prakondisi : Diet tinggi lemak

4.3.2. Definisi Operasional

1. Ekstrak *Moringa oleifera*

Ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) adalah hasil ekstraksi dengan menggunakan metode maserasi dengan pelarut Ethanol p.a 70%. Hasil Ekstraksi dari daun kelor dibuat sediaan dengan 2 macam dosis, yaitu dengan besaran dosis 400mg/kgBB/hari dan 800mg/kgBB/hari masing-masing sebanyak 2 mL/dosis. Pembuatan ekstraksi dilakukan di Laboratorium Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Teknologi Bandung, dengan konfirmasi fitokimia menggunakan GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrofotometric*). Adapun dosis pemberian ekstrak daun kelor pada hewan coba dilakukan 1x sehari, selama 14 hari dengan cara sonde di Laboratorium IBL Fakultas Kedokteran UNISSULA.

Skala: Ordinal

2. Kadar TNF- α

Kadar TNF- α diperiksa dari sampel darah yang diambil dari vena orbita tikus pada hari ke-15 setelah pemberian perlakuan. Spesimen yang digunakan adalah serum. Kadar TNF- α dianalisis dengan teknik *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA).

Satuan: nanogram/mililiter (ng/ml)

Skala: Ratio

3. Kadar Interleukin-1 (IL-1)

Kadar IL-1 diperiksa dari sampel darah yang diambil dari vena orbita tikus pada hari ke-15 setelah pemberian perlakuan, dan dianalisis dengan teknik *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA).

Spesimen yang digunakan adalah serum

Satuan: nanogram/mililiter (ng/ml)

Skala: Ratio

4.4. Alat dan Bahan Penelitian

4.4.1. Alat

Alat yang digunakan untuk penelitian :

1. Set alat ekstraksi maserasi
2. *Rotary evaporator*
3. Blender
4. Sduit dan jarum (alat sonde)
5. *Swing sentrifuge*
6. Pipa hematokrit

7. Mikropipet
8. Micropipet tip uk 100 μ L dan 10 μ L
9. Vial Tube 1,5mL

4.4.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian :

1. Ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.),
2. Ethanol pa. 70%
3. Pakan tikus standar
4. Diet tinggi lemak dengan pakan tikus merk BR549
5. Aquades,
6. Kloroform
7. Atorvastatin
8. Rat TNF- α ELISA kit
9. Rat IL-1 ELISA kit

4.5. Prosedur Penelitian

4.5.1. Cara Pembuatan Ekstrak Daun Kelor (*Moringa Oleifera* Lam.)

Daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) sebanyak sekitar 1000 gr dicacah, dan didehidrasi pada suhu 50-60°C dan atau dikeringkan dibawah terik sinar maathari dan dihaluskan hingga menjadi bubuk kering. Bubuk kering simplisia daun kelor diekstraksi melalui proses maserasi menggunakan etanol pa. 70%. Larutan yang sudah selesai diekstraksi disaring dengan menggunakan kain kasa steril, serta dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring whatmann yang telah disteril, dilakukan secara berulang

untuk mendapatkan rendemen yang cukup banyak, untuk kemudian dimasukkan ke dalam wadah labu bundar, dan diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40-60°C.

4.5.2. Konfirmasi Fitokimia Ekstrak Daun Kelor

Ekstrak daun kelor yang telah didapatkan dari proses ekstraksi dengan metoda maserasi, dipersiapkan untuk dilakukan konfirmasi fitokimia yang terdapat didalam ekstrak daun kelor. Sejumlah 5 mL sampel ekstrak daun kelor dipersiapkan untuk dilakukan Analisa Fitokimia menggunakan GC-MS, data yang diperoleh dari GC-MS berupa chromatogram yang memuat waktu retensi dan juga prosentase kandungan senyawa didalam ekstrak daun kelor.⁶⁰

4.5.3. Penetapan Dosis

1. Dosis Atorvastatin

Obat Atorvastatin sudah sering digunakan sebagai obat standard untuk mengatasi hiperlipidemia pada hewan coba. Pada tikus yang digunakan, dosis yang diberikan sejumlah 5mg/kgBB/hari.⁵⁸ Pada penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, penggunaan atorvastatin sudah dapat mempengaruhi kadar lipid darah pada tikus saat pemberian hari ke-14.¹⁵

2. Dosis Ekstrak Daun Kelor

Penentuan dosis pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) ditentukan serupa berdasarkan penelitian terdahulu, dimana

pada penelitian sebelumnya, digunakan dosis daun kelor sejumlah 400mg/kgBB terbukti memiliki efek hipokolesterolemia.¹⁸ Oleh karenanya dalam penelitian yang dilaksanakan digunakan dosis sejumlah tersebut.

4.5.4. Komposisi Diet Tinggi Lemak

Diet Tinggi Lemak dilakukan dengan memberikan pakan dengan kadar lemak tinggi, pakan yang sering digunakan adalah pakan tikus merk BR549, dengan komposisi:

Tabel 4.1. Komposisi Diet Tinggi Lemak

Komposisi	Kadar (%)
Air	13,0 (max)
Protein kasar	15,0 (min)
Lemak kasar	5,0 (min)
Serat kasar	9,0 (max)
Kalsium	0,7-1,2
Fosfor	0,5
Aflatoksin	60 µ/kg
Lisin	0,63
Mationin	0,25

Diet tinggi lemak ditunjang menggunakan konsumsi kuning telur puyuh secara sonde kepada hewan coba, telur kuning puyuh sendiri memiliki kandungan kolesterol hingga 844 mg/100 gram butir telur puyuh.⁷⁵

4.5.5. Validasi Hiperlipidemia

Induksi diet tinggi lemak selama 4 minggu terhadap tikus coba, setelahnya untuk mengkonfirmasi keadaan hiperlipidemiaa pada tikus dilakukan validasi untuk memastikan semua tikus sudah menjadi tikus

hiperlipidemia. Dalam proses validasi digunakan indikator validasi yang dengan parameter:

Tabel 4.2. Validasi Hiperlipidemia Tikus Sprague dawley⁶⁰

Parameter	Mean $\pm$ SD	Median
Kolesterol total (mg/dL)	41,06 $\pm$ 14,9	42,8
Trigliserid (mg/dL)	21,74 $\pm$ 12,1	18,3
HDL (mg/dL)	22,79 $\pm$ 12,6	22,4
LDL (mg/dL)	13,75 $\pm$ 16,5	13,04

4.5.6. Persiapan Sebelum Perlakuan

1. Sebanyak 20 tikus Jantan galur *Sprague dawley* dipilih dan didapatkan, kemudian tikus diadaptasikan selama 1 minggu terhadap kondisi laboratorium;
2. Dilakukan pembagian kelompok secara random menjadi 4 kelompok terhadap tikus, dalam hal ini terbagia atas kelompok kontrol negatif, kontrol positif, perlakuan 1 dan perlakuan 2;
3. Keseluruhan tikus mendapat induksi diet tinggi lemak selama 2-4 minggu tanpa terkecuali, untuk mendapatkan kondisi hiperlipidemiaa;
4. Setelah proses diinduksi selesai, dilakukan proses validasi terhdapa tikus untuk mengetahui apakah telah mencapai kondisi hiperlipidemia dengan melakukan tes kadar kolesterol total, dan pengukuran Berat Badan Total;
5. Setelah semua tikus dipastikan sudah tervalidasi menjadi tikus hiperlipidemia, untuk selanjutnya tikus mendapat perlakuan sesuai dengan kelompok masing-masing, dengan jenis perlakuan kelompok:
 - a. Kelompok kontrol negatif: placebo (aquades yang disondekan)

- b. Kelompok kontrol positif: atorvastatin 5mg/kgBB
 - c. Kelompok perlakuan 1: ekstrak daun kelor 400mg/kgBB/hari
 - d. Kelompok perlakuan 2: ekstrak daun kelor 800mg/kgBB/hari
6. Setelah dilakukan perlakuan sesuai kelompoknya selama 14 hari, maka untuk selanjutnya semua tikus dipuasakan selama 12 jam, untuk kemudian diambil darahnya melalui plexus vena retro-orbital. Untuk langkah terakhir setelah itu semua tikus dilakukan terminasi.

4.5.7. Prosedur Pengambilan Sampel Sebagai Spesimen

1. Setelah tikus selesai mendapatkan perlakuan sebagaimana yang telah ditentukan, maka tikus dipuasakan selama 12 jam.
2. Tikus yang telah dipuasakan dianestesi menggunakan kloroform
3. Pengambilan sampel darah dilakukan pada area plexus vena retro-orbital dengan pipa kapiler sebanyak $\pm 1,5$ mL.
4. Darah tersebut disimpan di dalam tabung reaksi bersih tanpa antikoagulan, untuk selanjutnya dapat dilakukan preparasi specimen.

4.5.8. Preparasi Spesimen

1. Sampel darah tikus yang diambil melalui plexus vena retro-orbital untuk selanjutnya ditampung di dalam tube
2. Darah yang telah ditampung didiamkan pada suhu ruang selama 10-20 menit
3. Sampel darah dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 2000-3000 RPM selama 20 menit

4. Serum darah tikus kemudian dipisahkan dan dapat disimpan pada suhu -20°C untuk selanjutnya dapat dianalisis.

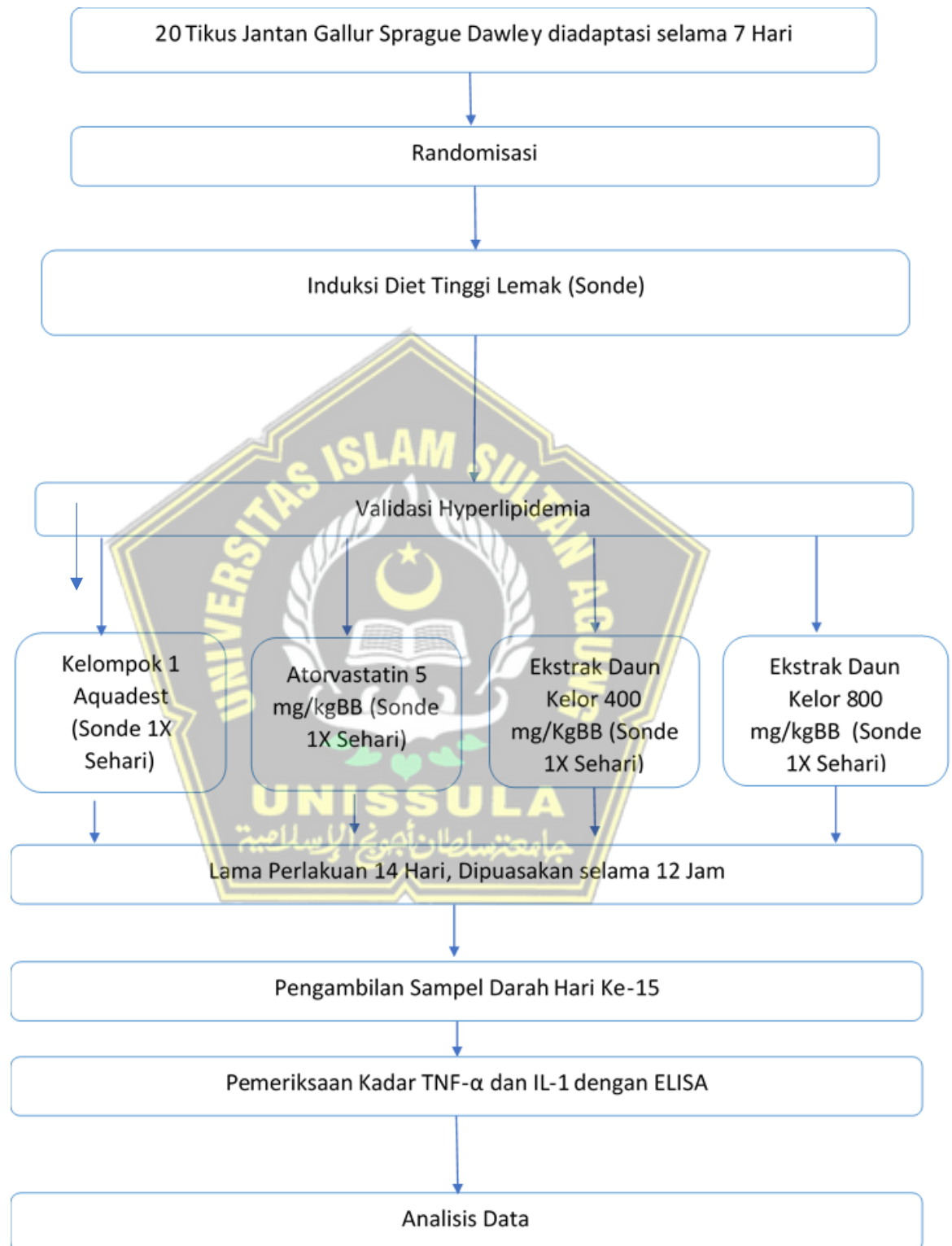
4.5.9. Pemeriksaan Kadar TNF- α dan IL-1

1. Seluruh reagen, larutan standar dan sampel sesuai instruksi dipersiapkan, kemudian semua reagen dibawa dan dikondisikan pada suhu ruang sebelum digunakan. Pemeriksaan dilakukan pada suhu ruang
2. Tentukan jumlah strip yang akan digunakan untuk pengujian kadar.
3. Tambahkan $50\mu\text{l}$ specimen ke *well tube* standard
4. Tambahkan $40\mu\text{l}$ sampel ke dalam sumur sampel lalu ditambahkan $10\mu\text{l}$ antibody anti-TNF- α dan atau anti-IL-1 ke dalam sumur sampel, kemudian tambahkan $50\mu\text{l}$ streptavidin-HRP ke dalam *well tube* sampel dan *well tube* standar. Campur kedua larutan, tutup dengan *sealer*. Perlu dilakukan Inkubasi 60 menit pada suhu 37°C .
5. Lepaskan sealer dan cuci plate sebanyak 5x dengan larutan *buffer* pencuci. Kemudian rendam sumur dengan larutan *buffer* pencuci sejumlah $300\mu\text{l}$ selama 30-60 detik untuk setiap kali pencucian.
6. Tambahkan $50\mu\text{l}$ larutan substrat A ke tiap lubang *well tube*, kemudian perlu ditambahkan $50\mu\text{l}$ larutan substrat B ke tiap lubang *well tube*. Perlu dilakukan Inkubasi *plate* dengan posisiditutup *sealer* baru selama 10 menit pada suhu 37°C pada tempat yang gelap.

7. Perlu ditambahkan 50 μ l *stop solution* ke tiap sumur, dalam hal ini akan terjadi perubahan dari warna biru menjadi kuning.
8. Nilai densitas optik (nilai OD) setiap sumur perlu ditentukan dengan menggunakan pembaca *plate* mikro yang disetel ke 450 nm, selama kurun waktu 10 menit setelah ditambahkan larutan penghenti.



4.6. Alur Penelitian

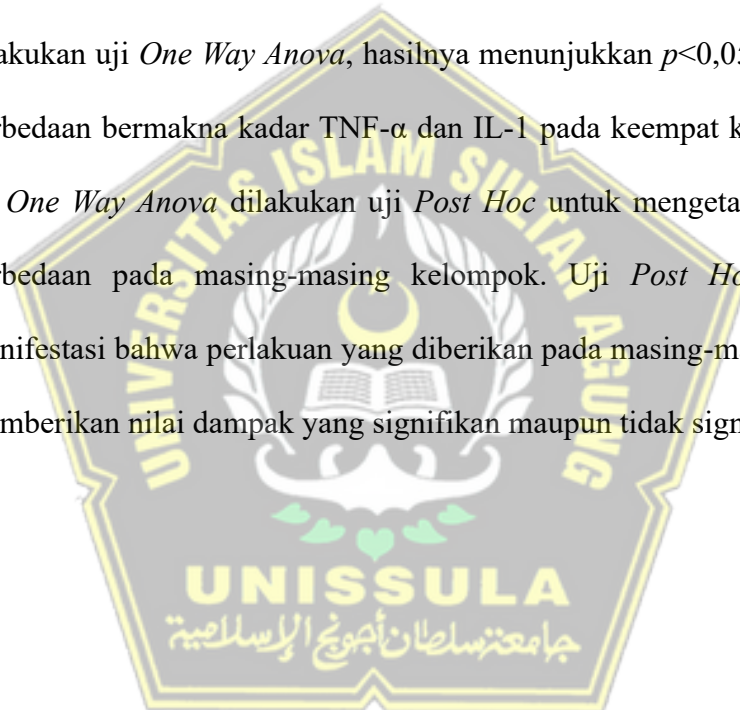


Gambar 4.2. Alur Penelitian

4.7. Analisa Data

Data yang sudah didapat dari pengujian kadar TNF- α dan IL-1 kemudian dianalisis menggunakan program SPSS. Data yang didapatkan dilakukan uji deskriptif terlebih dahulu, untuk kemudian dilakukan uji normalitas data dengan uji *Shapiro Wilk* dan uji variasi data dengan uji *Levene*.

Hasil uji data yang didapatkan normal dengan variasi homogen, maka dilakukan uji *One Way Anova*, hasilnya menunjukkan $p < 0,05$ maka terdapat perbedaan bermakna kadar TNF- α dan IL-1 pada keempat kelompok. Hasil uji *One Way Anova* dilakukan uji *Post Hoc* untuk mengetahui signifikansi perbedaan pada masing-masing kelompok. Uji *Post Hoc* memberikan manifestasi bahwa perlakuan yang diberikan pada masing-masing kelompok memberikan nilai dampak yang signifikan maupun tidak signifikan.



BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian yang dilakukan digunakan hewan coba tikus putih galur *Sprague dawley* jantan yang sebagai parameter pra-kondisinya di induksi menggunakan diet tinggi lemak. Jumlah hewan coba yang digunakan sejumlah 20 tikus putih yang telah diadaptasikan dengan kondisi laboratorium, untuk kemudian semua tikus dilakukan induksi diet tinggi lemak. Sejumlah 20 ekor tikus putih tersebut dibagi menjadi 4 kelompok penelitian yang terbagi atas 2 Kelompok perlakuan, 1 Kelompok Kontrol Negatif, 1 kelompok Kontrol positif. Pengecekan kadar kolesterol digunakan untuk validasi kondisi hiperlipidemia, yang untuk kemudian diberi perlakuan sesuai dengan kelompok.

5.1. Hasil Penelitian

5.1.1. Ekstraksi Daun Kelor dan Konfirmasi Fitokimia GC-MS

Untuk mendapatkan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) digunakan metoda ekstraksi Maserasi dengan pelarut Ethanol p.a 70%, yang nantinya didapatkan ekstrak kasar setelah dilakukan evaporasi menggunakan *rotary evaporator*. Sejumlah 1000 gram simplisia kering daun kelor yang di ekstrak didapatkan sejumlah ekstrak kasar setelah rotary evaporator sejumlah 128 gram, nilai rendemennya secara perhitungan didapatkan sejumlah 12.8%. Kandungan zat aktif dalam metabolit ekstrak daun kelor dikonfirmasi kandungan fitokimianya menggunakan *Gas Chromatography-Mass Spectrophotometry (GC-MS)*. Hasil dari GC-MS akan berupa persentase jumlah kandungan masing-zat aktif, yang dapat dikelompokkan sesuai dengan golongan

dari antioksidan, alkaloid, terpenoid, dan juga beberapa golongan lainnya.

Adapun hasil dari konfirmasi fitokimia menggunakan GC-MS.

Tabel 5.1 : Konfirmasi Fitokimia GC-MS Ekstrak Daun Kelor

No	Senyawa Metabolite	Persentase Kadar	Golongan	Persentase Total Golongan
1	2-Furancarboxaldehyde, 5-(hydroxymethyl)-	14,16	Polisakarida	15,28
2	2-Furanmethanol	0,65		
3	2(3H)-Furanone, dihydro-Butyrolactone	0,47		
4	2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one	6,57	Vitamin	14,07
5	Beta-l-mannopyranose, 5-O-acetyl-thio-octyl-	7,5		
6	Benzeneacetonitrile, 4-hydroxy-	12,07		
7	1,2-Benzenedicarboxylic acid, diethyl ester (CAS) Et	0,31	Polifenol	12,68
8	4-((1E)-3-Hydroxy-1-propenyl)-2-methoxyphenol	0,3		
9	Beta-l-Rhamnofuranoside, 5-O-acetyl-thio-octyl-	13,31		
10	Cyclopentanone, 2-ethyl-	0,08	Alkaloid	22,63
11	5-O-Acetyl-Thio-Octyl-Beta-L-Rhamnofuran	9,24		
12	2-Dimethyl(trimethylsilylmethyl)-Malonic Acid	17,03	Ester- Asam Lemak Tak Jenuh	17,03
13	Dodecanoic acid-Lauric acid	6,13		
14	Tetradecanoic acid	4,45		
15	Hexadecanoic acid-Palmitic acid	3,46	Ester- Asam Lemak	14,57
16	Fumaric acid, ethyl 2-methylallyl ester	0,14		
17	Butanoic acid, 3-oxo-, hexyl ester	0,11		
18	Octadecanoic acid	0,28	Terpenoid	2,35
19	Octadec-9-enoic Acid	1,48		
20	Heptadecane-(8)-carbonic acid-(1)	0,58		
21	3-Hexenoic acid, 3-methyl-, methyl ester	0,09		
22	Megastigmatrienone	0,2		

Senyawa yang terkandung didalam metabolit ekstrak daun kelor secara dominan banyak mengandung zat aktif yang diantaranya meliputi senyawa golongan alkaloid, terpenoid, polifenol dan golongan vitamin yang memiliki kemampuan sebagai antioksidan dan anti-inflamasi,⁶³ yang mampu mempengaruhi absorpsi lipid didalam rantai reaksi metabolisme didalam tubuh.

5.1.2. Validasi Kondisi Hiperlipidemia

Validasi kondisi hiperlipidemia perlu dilaksanakan untuk memastikan bahwa kelompok tikus yang diberikan perlakuan dalam kondisi hiperlipidemia, sebagai awal penentuan kondisi hiperlipidemia dilakukan timbang berat badan dari kelompok tikus pada kondisi sebelum induksi diet tinggi lemak dengan setelah induksi diet tinggi lemak, perbandingan data hasil timbang dapat dilihat pada tabel 5.2.

Tabel 5.2 : Perbandingan Nilai Rerata Berat Badan Tikus

Variabel	Kelompok	Mean $\pm$ SD
Pra Induksi	K1	252.00 $\pm$ 8.36
	K2	254.00 $\pm$ 5.47
	K3	252.00 $\pm$ 4.47
	K4	252.00 $\pm$ 8.36
Pasca Induksi	K1	276.00 $\pm$ 5.47
	K2	270.00 $\pm$ 7.07
	K3	274.00 $\pm$ 5.47
	K4	272.00 $\pm$ 8.36
Pasca Perlakuan	K1	268.00 $\pm$ 8.36
	K2	254.00 $\pm$ 5.47
	K3	248.00 $\pm$ 8.36
	K4	248.00 $\pm$ 8.36

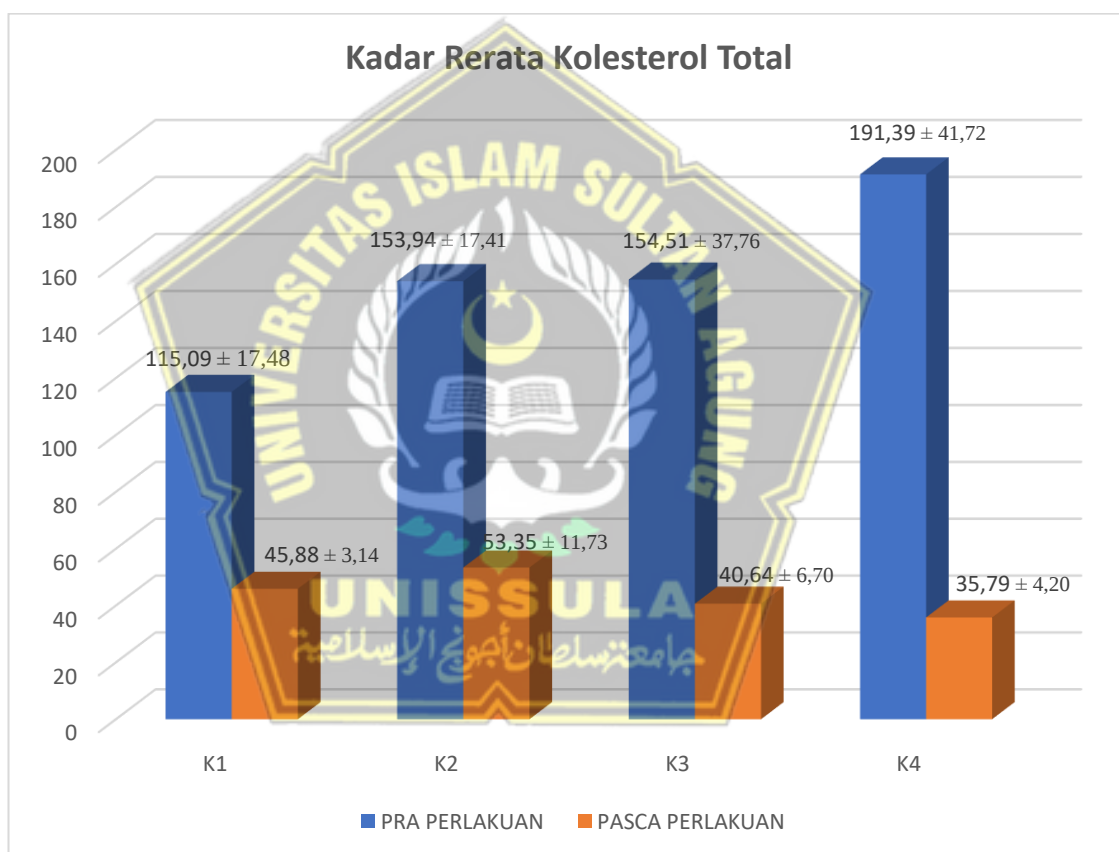
Induksi dengan diet tinggi lemak dapat menaikkan berat badan tikus, yang awalnya memiliki berat badan pada kisaran 250 gram pada masing-masing kelompok, setelah induksi tinggi lemak menunjukkan adanya kenaikan berat badan; kisaran 270 gram; naik sekitar 20 gram pada masing-masing kelompok. Berat badan tikus yang meningkat tentunya cukup linier dengan kondisi hiperlipidemia yang akan dikonfirmasi menggunakan pengukuran kolesterol. Hiperlipidemia pada tikus divalidasi dengan mengukur kadar kolesterol total pada masing-masing kelompok. Perbandingan kadar kolesterol total antar kelompok perlakuan dapat dilihat pada tabel 5.3. dengan kondisi bahwa kelompok pra perlakuan tervalidasi hiperlipidemia.

Tabel 5.3 : Hasil Validasi Kadar Kolesterol Total

Variabel	Kelompok	Mean $\pm$ SD	Keterangan
Kadar Kolesterol Pra Perlakuan	K1	115.09 $\pm$ 17.48	Hiperlipidemia
	K2	153.94 $\pm$ 17.41	
	K3	154.51 $\pm$ 37.76	
	K4	191.39 $\pm$ 41.72	
Kadar Kolesterol Pasca Perlakuan	K1	45.88 $\pm$ 3.13	Normal
	K2	53.35 $\pm$ 11.72	
	K3	40.64 $\pm$ 6.69	
	K4	35.79 $\pm$ 4.19	

Kadar rata-rata kolesterol pada tikus normal berada pada kisaran 10-54 mg/dL,⁶⁴ pada data kelompok sebelum perlakuan menunjukkan bahwa kadar kolesterol telah melebihi kadar kolesterol normal. Kadar kolesterol pada masing-masing kelompok secara signifikan setelah perlakuan terjadi penurunan pada

kelompok 4; dengan nilai 35.79 ng/L; selisih pre-post sebesar 155.60 ng/L. Kelompok 1 menunjukkan adanya penurunan yang signifikan, hal ini memungkinkan bahwa induksi diet tinggi lemak merupakan suatu kondisi yang *reversible*,⁶⁵ pra-pasca perlakuan yang terjadi antar kelompok terlihat signifikansi perubahan rerata kadar kolesterol total, menunjukkan adanya kemungkinan saat kondisi hiperlipidemia linier dengan kondisi inflamasi.



Grafik 1.1: Kadar Kolesterol Pra-Pasca Perlakuan

Berkenaan dengan kadar kolesterol setelah perlakuan, dilakukan uji terhadap data yang dihasilkan, untuk mengetahui signifikansi dari perbedaan antar kelompok.

Tabel 5.4: Analisis Kadar Kolesterol Total Pasca Perlakuan

Variabel	Kelompok	Mean $\pm$ SD	Uji <i>Shapiro-Wilk</i>	Uji <i>Levene</i>	Uji <i>One-Way Anova</i>
Pasca Perlakuan	K1	45.88 $\pm$ 3.13	0.876	0.079	0.009
	K2	53.35 $\pm$ 11.72	0.734		
	K3	40.64 $\pm$ 6.69	0.503		
	K4	35.79 $\pm$ 4.19	0.481		

Uji *Shapiro Wilk* dan *Levene's test* signifikan dengan ($p > 0.05$), *One Way Anova* signifikan dengan ($p < 0.05$)

Kadar kolesterol setelah perlakuan menunjukkan adanya penurunan yang cukup signifikan, secara statistik terkonfirmasi saat dilakukan uji *Shapiro-Wilk* dan Uji *Levene* yang memberikan nilai $p > 0.05$, yang memberikan makna bahwa perbedaan kolesterol setelah induksi dengan post-perlakuan terjadi memiliki makna sebaran yang normal dan Homogen. Hasil uji Anova $p < 0.05$ memiliki makna bahwa penurunan kadar kolesterol total bernilai signifikan dan bermakna.

Perbedaan yang bermakna di uji lanjutan menggunakan uji *Post Hoc* untuk melihat apakah pada kelompok mana terjadi perbedaan yang bermakna.

Tabel 5.5 : Uji Post Hoc Kolesterol Total

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Signifikansi
K1	K2	0.390
	K3	0.669
	K4	0.165
K2	K3	0.059
	K4	0.007
K3	K4	0.719

Signifikansi $p < 0.05$

5.1.3. Pengukuran Kadar Interleukin-1 (IL-1)

Hasil pengukuran kadar Interleukin-1 pada masing-masing kelompok dapat dilihat pada tabel yang menjelaskan nilai signifikansi dari kadar IL-1 setelah perlakuan pada tikus.

Tabel 5.6: Analisis Pengukuran Kadar Interleukin-1 (IL-1)

Variabel	Kelompok	Mean $\pm$ SD	Uji Shapiro-Wilk	Uji Levene	Uji One-Way Anova
Kadar IL-1	K1	24.74 $\pm$ 6.17	0.124	0.518	0.03
	K2	20.76 $\pm$ 5.32	1.000		
	K3	24.07 $\pm$ 4.91	0.532		
	K4	15.33 $\pm$ 2.42	0.177		

Uji *Shapiro Wilk* dan *Levene's test* signifikan dengan ($p > 0.05$), *One Way Anova* signifikan dengan ($p < 0.05$)

Hasil uji Shapiro-Wilk dan Uji Levene; nilai $p > 0.05$; menunjukkan bahwa data pengukuran kadar IL-1 normal dan homogen, hasil uji One Way Anova juga menunjukkan adanya signifikansi; nilai $p < 0.05$; dalam penelitian ini memiliki makna bahwa adanya pengaruh yang bermakna pada kadar *Interleukin-1*. Kelompok yang memberikan perbedaan bermakna pada kadar rata-rata IL-1 setiap kelompok dapat diperbandingkan melalui hasil uji Post-Hoc, berikut data hasil uji Pos Hoc sebagaimana pada table 5.5

Tabel 5.7 : Uji Pos Hoc IL-1

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Signifikansi
K1	K2	0.587
	K3	0.996
	K4	0.036
K2	K3	0.713
	K4	0.333
K3	K4	0.054

Signifikansi $p < 0.05$

Berdasarkan uji Pos Hoc menunjukkan bahwa terjadi perbedaan yang bermakna antara kelompok 1 dengan kelompok 4, sedangkan perbedaan antar kelompok yang lain tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna.

5.1.4. Pengukuran Kadar Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)

Hasil pengukuran beserta uji kadar rata-rata TNF- α dapat dilihat pada tabel 5.8 yang memberikan makna normalitas, homogenitas data dan signifikansi perbedaan antar kelompok.

Tabel 5.8 : Analisis Pengukuran Kadar TNF- α

Variabel	Kelompok	Mean $\pm$ SD	Uji Shapiro-Wilk	Uji Levene	Uji One-Way Anova
Kadar TNF-Alpha	K1	84.81 $\pm$ 19.46	0.911	0.830	0.420
	K2	84.68 $\pm$ 20.75	0.423		
	K3	79.25 $\pm$ 24.35	0.489		
	K4	65.48 $\pm$ 16.10	0.549		

Uji *Shapiro Wilk* dan *Levene's test* signifikan dengan ($p > 0.05$), *One Way Anova* signifikan dengan ($p < 0.05$)

Hasil uji Saphiro-Wilk dan uji Levene's masing-masing memiliki nilai $p > 0.05$, makna dari nilai tersebut menyatakan bahwa data dari hasil pengukuran normal dan homogen. Hasil uji One-Way Anova sendiri memiliki nilai $p > 0.05$ yang artinya tidak ada perbedaan bermakna pada antar kelompok penelitian.

5.2. Pembahasan

Rendemen proses ekstraksi daun kelor didapatkan sejumlah 128 gram, dengan persentase 12.8%, hasil rendemen tersebut dikategorikan baik, rendemen ekstraksi yang baik diatas 10%.⁶⁶ Konfirmasi fitokimia menggunakan GC-MS menghasilkan data metabolit zat aktif beberapa golongan, yang antara lain golongan

ester-asam lemak, alkaloid, terpenoid, dan vitamin. Metabolit zak aktif tersebut yang dapat mempengaruhi absorpsi dan metabolisme pada hewan coba.

Hasil konfirmasi fitokimia menggunakan GC-MS pada ekstrak daun kelor menghasilkan persentase total pada masing-masing golongan senyawa metabolite sebesar 22.63% untuk golongan alkaloid, 14.07% untuk golongan Vitamin, 12.68% golongan fenolik, 2.35% golongan terpenoid, 15.28% golongan polisakarida, dan sejumlah 39.66% untuk golongan ester asam lemak. Senyawa metabolit yang terkandung dalam ekstrak daun kelor memiliki bioaktivitas yang antara lain sebagai antioksidan, anti-inflamasi dan memiliki aktivitas sebagai anti-aterosklerosis,⁶⁷ ketika dikonsumsi. Induksi tinggi lemak mempengaruhi kadar kolesterol total pada tikus. Serta menjadikan kenaikan berat badan pada tikus. Hasil pengujian kadar kolesterol total memvalidasi bahwa kondisi tikus telah mencapai kondisi hiperlipidemia. Kondisi hiperlipidemia pada tikus normal memiliki kadar kolesterol total pada kisaran 10-54 mg/dL⁶¹, dan pasca induksi tinggi lemak kadar kolesterol total pada tikus berada diatas kadar normal tersebut. Setelah perlakuan dengan pemberian ekstrak daun kelor menghasilkan adanya penurunan kadar kolesterol total pada tikus, pada hasil uji Anova menunjukkan bahwa ada perbedaan yang signifikan pada antar kelompok percobaan. Pengaruh kenaikan kadar kolesterol pada tikus menjadikan kenaikan kadar ROS hingga terjadi *Stress Oksidatif* menginduksi jalur NF-kB sehingga akan mengaktifasi transkripsi sitokin pro-inflamasi *Interleukin-1* (IL-1) dan *Tumor Necrosis Factor-α* (TNF-α).⁶⁸

Kondisi *Stress Oksidatif* akibat dapat dihambat menggunakan senyawa dari golongan alkaloid;^{69,70} sebagai antioksidan; yang menyeimbangkan O₂ radikal

bebas. Radikal bebas pada tubuh dapat dihambat pembentukannya melalui kehadiran senyawa-senyawa golongan vitamin, terutama vitamin C,⁷¹ aktivitasnya sebagai antioksidan mampu menyumbangkan elektron, sehingga dapat melindungi biomolekul penting (protein, lipid, karbohidrat, dan asam nukleat) agar tidak rusak oleh oksidan, termasuk ROS.⁷² Penelitian lain menunjukkan bahwa senyawa fenolik juga mampu mengatasi stress oksidatif dengan bioaktivitas sebagai antioksidan dan anti-inflamasi.⁷³ Konfirmasi fitokimia pada ekstrak daun kelor menggunakan GC-MS menunjukkan adanya persentase yang tinggi pada golongan alkaloid, fenolik serta golongan vitamin berturut-turut sebesar 22.63% , 12.68% dan 14.07%.

Penelitian yang dilakukan pemberian ekstrak daun kelor pada tikus yang tervalidasi hiperlipidemia diberikan dengan dosis 400 mg/kgBB dan 800 mg/KgBB dengan frekuensi 1 kali sehari selama 14 hari. Pengukuran kadar IL-1 setelah pemberian ekstrak daun kelor menunjukkan bahwa adanya pengaruh yang signifikan, nilai signifikansinya ditunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada kelompok 1 (kontrol negatif) dengan kelompok 4 (dosis 800 mg/KgBB) dan pada kelompok 3 (dosis 400 mg/KgBB) dengan kelompok 4 (dosis 800 mg/KgBB). Penurunan kadar IL-1 pada penelitian ini linier dengan turunnya kadar kolesterol pada tikus, didukung dengan adanya penurunan berat badan. Adanya penurunan kadar kolesterol total pada tikus mempengaruhi respon Nf-kB dengan menurunkan kadar sitokin IL-1. Kemampuan ekstrak daun kelor dalam menurunkan kadar IL-1 menunjukkan adanya kemampuan sebagai antiinflamasi serta antioksidan pada proses inflamasi. Hasil ini cukup linier dengan penelitian sebelumnya, aspek

metabolik penelitian sebelumnya menunjukkan pemberian dosis 400 mg/KgBB mempengaruhi penurunan kolesterol dan LDL. Penelitian yang dilakukan menunjukkan adanya perubahan aspek proteomik khususnya IL-1 dengan memberikan pengaruh penurunan yang signifikan pada dosis 800 mg/KgBB, memiliki linieritas dengan penurunan kolesterol total pada tikus.

Nilai kadar rerata IL-1 terendah terdapat pada kelompok 4 (dosis 800 mg/kgBB) dengan nilai 15.33 pg/mL. Nilai tersebut apabila diperbandingkan antar kelompok memiliki nilai terendah, namun nilai yang paling rendah ini belum dapat menunjukkan nilai yang normal atau tidak. Untuk melihat sistematis apakah nilai kadar tersebut merupakan nilai yang baik, dimungkinkan adanya *perubahan epigenetik*⁷⁴(perubahan status ekspresi gen tanpa mengubah status DNA) maupun ekspresi dari gen IL-1 itu sendiri. Belum terkonfirmasi nilai yang normal dikarenakan dalam penelitian ini belum dapat diketahui nilai normal kadar IL-1 pada tikus sehat. Belum diketahuinya nilai normal tersebut menjadi poin keterbatasan pada penelitian ini.

Pengukuran kadar TNF- α pasca perlakuan memberikan hasil yang menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang cukup bermakna antar kelompok tikus. Perbedaan yang tidak cukup bermakna ini tidak berarti bahwa pemberian ekstrak daun kelor tidak memiliki pengaruh kepada kadar TNF- α pada model tikus hiperlipidemia. Hasil uji yang tidak cukup bermakna pada perbedaan antar kelompok dimungkinkan karena inflamasi akut yang terjadi pada tikus sudah terlewat, atau dalam hal ini tikus sudah dalam kondisi sembuh kembali. Nilai rerata kadar TNF- α yang tidak bermakna ini secara klinis belum dapat mengkonfirmasi

apakah ekstrak daun kelor memberikan pengaruh pada kadar TNF- α pada hewan coba. Nilai kadar TNF- α normal pada tikus sehat masih belum diketahui pada penelitian ini, sehingga menjadikan keterbatasan pada penelitian, khususnya untuk mengkonfirmasi nilai kadar TNF- α normal pada tikus sehat. Terdapatnya keterbatasan penelitian, dimasa mendatang penelitian lebih lanjut mengenai pengukuran kadar TNF- α pada model tikus hiperlipidemia perlu dilakukan dengan model pengukuran kadar TNF- α pada awal perlakuan, tengah-tengah perlakuan dan akhir dari perlakuan, serta pengukuran kadar TNF- α dan IL-1 pada tikus sehat untuk mengetahui nilai *cut off* perubahan kadar TNF- α dan IL-1 pada tikus yang sehat.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan Penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) dengan dosis 400mg/kgBB/hari dan 800mg/kgBB berpengaruh terhadap kadar IL-1 (*Interleukin-1*) pada tikus *Sprague dawley* Hiperlipidemia.
2. Pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) dengan dosis 400mg/kgBB/hari dan 800mg/kgBB tidak memiliki pengaruh terhadap kadar TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*) pada tikus *Sprague dawley* Hiperlipidemia.
3. Perbedaan rerata berbeda signifikan bermakna pada kadar IL-1 pada kelompok dosis 800 mg/kgBB, sedangkan pada kadar TNF- α tidak memiliki perbedaan yang signifikan pada antar kelompok

6.2. Saran

1. Penelitian ditambahkan pengukuran kadar TNF- α dan IL-1 dengan variasi pengukuran rentang waktu pengukuran yang meliputi awal perlakuan, tengah perlakuan dan akhir perlakuan.
2. Perlu dilakukan penambahan kelompok sehat yang diukur kadar TNF- α dan IL-1 sebagai nilai pembanding tikus sehat.
3. Perlu dilakukan pengukuran kadar TNF- α dan IL-1 sebelum perlakuan masing-masing kelompok.
4. Perlu dilakukan penelitian mengenai mekanisme utama dari *isolate* ekstrak daun kelor dalam mempengaruhi ekspresi gen IL-1 dan TNF- α .

DAFTAR PUSTAKA

1. Ezzat, S. M., El Bishbishy, M. H., Aborehab, N. M., Salama, M. M., Hasheesh, A., Motaal, A. A., Rashad, H., & Metwally, F. M. (2020). Upregulation of MC4R and PPAR- α expression mediates the anti-obesity activity of *Moringa oleifera* Lam. in high-fat diet-induced obesity in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 251, 112541. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112541>
2. Hill MF, Bordoni B. Hiperlipidemiaa. [Updated 2023 Aug 8]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559182/>
3. Mayo Clinic.2022. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/high-blood-cholesterol/in-depth/statin-side-effects/art-20046013> Diakses 25 Oktber 2024
4. Helmy, S. A., Morsy, N. F. S., Elaby, S. M., & Ghaly, M. A. A. (2017). Hypolipidemic effect of moringa oleifera lam leaf powder and its extract in diet-induced hypercholesterolemic rats. *Journal of Medicinal Food*, 20(8), 755–762. <https://doi.org/10.1089/jmf.2016.0155>
5. Clevelandclinic. 2022. <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/21656-hiperlipidemiaa>. Diakses 3 Oktober 2024
6. Liu T, Zhao D, Qi Y. Global Trends in the Epidemiology and Management of Dyslipidemia. *J Clin Med*. 2022 Oct 28;11(21):6377. doi: 10.3390/jcm11216377. PMID: 36362605; PMCID: PMC9656679.
7. Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) (2018). Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian RI tahun 2018. http://www.depkes.go.id/resources/download/infoterkini/materi_rakorpop_2018/Hasil%20Riskesdas%202018.pdf – Diakses Maret 2024.
8. Michael J.W., Norman E.L.,Erin D. Michos. Evolving Management of Low-Density Lipoprotein Cholesterol: A Personalized Approach to Preventing Atherosclerotic Cardiovascular Disease Across the Risk Continuum/ *Journal of the American Heart Association*. June 2023. v12(11). <https://doi.org/10.1161/JAHA.122.028892>
9. Moien AB Khan, Muhammad Jawad Hashim, Halla Mustafa, May Yousif Baniyas, Shaikha Khalid Buti Mohamad Al Suwaidi, Rana AlKatheeri, Fatmah Mohamed Khalfan Alblooshi, Meera Eisa Ali Hassan Almatrooshi, Mariam Eisa Hazeem Alzaabi, Reem Saif Al Darmaki, and Shamsa Nasser Ali Hussain Lootah. Global Epidemiology of Ischemic Heart Disease: Results from the Global Burden of Disease Study. *Cureus*. 2020 Jul; 12(7): e9349. Published online 2020 Jul 23. doi: 10.7759/cureus.9349
10. Onwe P.E., Folawiyo M. A., Anyigor-Ogah C. S., Uche J. E., Balogun M. E., Umahi G., Besong E. E., Okorocho A. E. and Afoke A.O. Extracts of *Moringa oleifera* a sure bet for Hiperlipidemiaa management. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS)*. 2015 Okt; 10 (5) Ver. III : 28-32.

11. Sha ZJ, Li CF, Tang SH, Yang HJ, Zhang Y, Li ZY, Yang B. [Efficacy and mechanism of new resource medicinal materia Moringa oleifera leaves against hiperlipidemiaa]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2021 Jul;46(14):3465-3477. Chinese. doi: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20210309.401. PMID: 34402268.
12. Chumark, P., Khunawat, P., Sanvarinda, Y., Phornchirasilp, S., Morales, N.P., Phivthongngam, L., Ratanachamnong, P., Srisawat, S., Klai-upsorn, S.P., 2008a. The in vitro and ex vivo antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of Moringa oleifera Lam. leaves. Journal of ethnopharmacology 116(3), 439-446.
13. Fernandes, D. M., Sousa, R. M. F., De Oliveira, A., Morais, S. A. L., Richter, E. M., & Muñoz, R. A. A. (2015). Moringa oleifera: A potential source for production of biodiesel and antioxidant additives. *Fuel*, 146, 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.12.081>
14. Jagat Pal Yadav, Ankit Kumar Singh, Maria Grishina, Prateek Pathak, Amita Verma, Vikas Kumar, Pradeep Kumar, Dinesh Kumar Patel. Insights into the mechanisms of diabetic wounds: pathophysiology, molekular targets, and treatment strategies through conventional and alternative therapies. *Inflammopharmacology*. 2024 Feb;32(1):149-228. doi: 10.1007/s10787-023-01407-6. Epub 2024 Jan 11. PMID: 38212535.
15. Tyroler HA. Cholesterol and cardiovascular disease. An overview of Lipid Research Clinics (LRC) epidemiologic studies as background for the LRC Coronary Primary Prevention Trial. *Am J Cardiol*. 1984 Aug 27;54(5):14C-19C. doi: 10.1016/0002-9149(84)90851-8. PMID: 6382998.
16. Mandana Hasanzad, Negar Sarhangi, Hamid Reza Aghaei Meybodi, Shekoufeh Nikfar, Pharmacogenetics and toxicology, Editor(s): Philip Wexler, Encyclopedia of Toxicology (Fourth Edition), Academic Press, 2024, Pages 467-491, ISBN 9780323854344. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824315-2.01077-0>.
17. Amiya E. Interaction of hiperlipidemiaa and reactive oxygen species: Insights from the lipid-raft platform. *World J Cardiol*. 2016 Dec 26;8(12):689-694. doi: 10.4330/wjc.v8.i12.689. PMID: 28070236; PMCID: PMC5183968.
18. Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev*. 2018 Jan;281(1):8-27. doi: 10.1111/imr.12621. PMID: 29247995; PMCID: PMC5756628.
19. Masli S, Turpie B. Anti-inflammatory effects of tumour necrosis factor (TNF)-alpha are mediated via TNF-R2 (p75) in tolerogenic transforming growth factor-beta-treated antigen-presenting cells. *Immunology*. 2009 May;127(1):62-72. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.02933.x. PMID: 18795974; PMCID: PMC2678182.
20. WebMD. <https://www.webmd.com/rheumatoid-arthritis/how-does-tnf-cause-inflammation>. Diakses 12 Oktober 2024

21. Jang, D., Lee, A., Shin, H., Song, H., Park, J., Kang, T., Lee, S., & Yang, S. (2021). *The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics*.
22. Li-Xia Du, Jian-Yu Zhu, Wen-Li Mi, Cytokines and Chemokines Modulation of Itch, *Neuroscience*, Volume 495, 2022, Pages 74-85, ISSN 0306-4522, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2022.05.035>.
23. Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech*. 2000 Aug 1;50(3):184-95. doi: 10.1002/1097-0029(20000801)50:3<184::AID-JEMT2>3.0.CO;2-H. PMID: 10891884.
24. Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, Shimoda T (Juli 2010). "TNF-alfa transmembran: struktur, fungsi dan interaksi dengan agen anti-TNF". *Rheumatology*. 49(7): 1215–1228. doi: 10.1093/rheumatology/keq031. PMC 2886310 . PMID 20194223.
25. Sinobiological. <https://www.sinobiological.com/resource/cytokines/what-is-tnf>. Diakses 15 Oktober 2024
26. You, K., Gu, H., Yuan, Z., & Xu, X. (2021). *Tumor Necrosis Factor Alpha Signaling and Organogenesis*. 9(July), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.727075>
27. Interpro. Global Biodata Coalition. <https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/InterPro/IPR002959/#PUB00006101>. Diakses 15 Oktober 2024
28. Ecks, M. J., & Sprang, S. R. (1989). *The Structure of Tumor Necrosis Factor-cr at 2.6*. 264(29), 17595–17605. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)71533-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)71533-0)
29. Falvo, James V., Alla V. Tsytsykova, and Anne E. Goldfeld. "Transcriptional control of the TNF gene." *TNF Pathophysiology* 11 (2010): 27-60.
30. Narayan, P. Manuscript, A. (2011). *NIH Public Access*. 20(2), 87–103.
31. Bruunsgaard, H., Skinhøj, P., & Pedersen, A. N. (2000). *Ageing , tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) and atherosclerosis*. *Cli.Exp.Immunol*. Vol. 121 : 255-260
32. Javed Ahamad, Faraat Ali, Manjoor Ahmad Sayed, Javed Ahmad, Leo Nollet. *Basic Principles and Fundamental Aspects of Mass Spectrometry. Mass Spectrometry in Food Analysis*. 2022 March;1(1):pp3-17. DOI:10.1201/9781003091226-2
33. Jasmine F, Shinkle J, Sabarinathan M, Ahsan H, Pierce BL, Kibriya MG. A novel pooled-sample multiplex luminex assay for high-throughput measurement of relative telomere length. *Am J Hum Biol*. 2018 Jul;30(4):e23118. doi: 10.1002/ajhb.23118. Epub 2018 Mar 12. PMID: 29527774; PMCID: PMC6105449.
34. Valaperti A, Li Z, Vonow-Eisenring M, Probst-Müller E. Diagnostic methods for the measurement of human TNF-alpha in clinical laboratory. *J Pharm*

- Biomed Anal. 2020 Feb 5;179:113010. doi: 10.1016/j.jpba.2019.113010. Epub 2019 Nov 28. PMID: 31816469.
35. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27: page 519–50. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132612>.
 36. Kaneko, N., Kurata, M., Yamamoto, T., Morikawa, S., & Masumoto, J. (2019). *The role of interleukin-1 in general pathology.* 5, 1–16.
 37. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood.* 2011 Apr 7;117(14):3720-32. doi: 10.1182/blood-2010-07-273417. Epub 2011 Feb 8. PMID: 21304099; PMCID: PMC3083294.
 38. Lachman LB, Hacker MP, Handschumacher RE. Partial purification of human lymphocyte-activating factor (LAF) by ultrafiltration and electrophoretic techniques. *J Immunol.* 1977;119:2019–23.
 39. Biotechnie. <https://www.rndsystems.com/resources/articles/interleukin-1>. Diakses 10 Oktober 2024.
 40. Fahum Umsu. 2024. <https://fahum.umsu.ac.id/blog/10-manfaat-daun-kelor-bagi-kesehatan/> Diakses 25 Oktober 2024
 41. Bai R, Tao L, Li B, Liu A, Dai X, Ji Z, Jian M, Ding Z, Luo L, Chen T, Ma M, Peng Y, Bao F. Using cytometric bead arrays to detect cytokines in the serum of patients with different types of pulmonary tuberculosis. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2019 Jan-Dec;33:2058738419845176. doi: 10.1177/2058738419845176. PMID: 31012357; PMCID: PMC6480993.
 42. Hadiwidjaja, S. (2004). *Pengaruh Interleukin-1 β (IL-1 β) dan Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) terhadap Dopamin pada Cerebral Palsy.* 1(1), 25–29. <https://doi.org/10.13057/biotek/c010105>
 43. Sanquin Laboratorium. <https://www.sanquin.org/products-and-services/immunomonitoring-services/clinical-immunomonitoring/assays/cytokine-analyses--elisa---cba>. Diakses 12 Oktober 2024
 44. Register, A. C., Tarighat, S. S., & Lee, H. Y. (2021). *Bioassay Development for Bispecific Antibodies — Challenges and Opportunities.*
 45. FKM Unair. <https://fkm.unair.ac.id/yuk-pahami-manfaat-dari-tanaman-moringa-oleifera-kelor-2/>. Diakses 15 Oktober 2024
 46. Pareek A, Pant M, Gupta MM, Kashania P, Ratan Y, Jain V, Pareek A, Chuturgoon AA. Moringa oleifera: An Updated Comprehensive Review of Its Pharmacological Activities, Ethnomedicinal, Phytopharmaceutical Formulation, Clinical, Phytochemical, and Toxicological Aspects. *Int J Mol Sci.* 2023 Jan 20;24(3):2098. doi: 10.3390/ijms24032098. PMID: 36768420; PMCID: PMC9916933.
 47. Irda F, Indradevi K, Marlia S. Phytochemistry and Pharmacology of Moringa Tree: An Overview. *Biointerface Research in Applied Chemistry.* 2021, 11(3):10776-10789. <https://doi.org/10.33263/BRIAC113.1077610789>

48. Guo, Z., Ali, Q., Abaidullah, M. et al. High fat diet–induced hiperlipidemiaa and tissue steatosis in rabbits through modulating ileal microbiota. *Appl Microbiol Biotechnol* 106, 7187–7207 (2022). <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12203-7>
49. Amiya E. Interaction of hiperlipidemiaa and reactive oxygen species: Insights from the lipid-raft platform. *World J Cardiol.* 2016 Dec 26;8(12):689-694. doi: 10.4330/wjc.v8.i12.689. PMID: 28070236; PMCID: PMC5183968.]
50. Morgan MJ, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling. *Cell Res.* 2011 Jan;21(1):103-15. doi: 10.1038/cr.2010.178. Epub 2010 Dec 28. PMID: 21187859; PMCID: PMC3193400.
51. Ting Liu, Lingyun Zhang, Donghyun Joo, Shao-Cong Sun. NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, Springer Nature. July 2017. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
52. Riaz Rajoka MS, Thirumdas R, Mehwish HM, Umair M, Khurshid M, Hayat HF, Phimolsiripol Y, Pallarés N, Martí-Quijal FJ, Barba FJ. Role of Food Antioxidants in Modulating Gut Microbial Communities: Novel Understandings in Intestinal Oxidative Stress Damage and Their Impact on Host Health. *Antioxidants (Basel).* 2021 Sep 30;10(10):1563. doi: 10.3390/antiox10101563. PMID: 34679698; PMCID: PMC8533511.
53. Su L, Mittal R, Ramgobin D, Jain R, Jain R. Current Management Guidelines on Hiperlipidemiaa: The Silent Killer. *J Lipids.* 2021 Jul 31;2021:9883352. doi: 10.1155/2021/9883352. PMID: 34394993; PMCID: PMC8363437.
54. Jia X, Xu W, Zhang L, Li X, Wang R, Wu S. Impact of Gut Microbiota and Microbiota-Related Metabolites on Hiperlipidemiaa. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021 Aug 19;11:634780. doi: 10.3389/fcimb.2021.634780. PMID: 34490132; PMCID: PMC8417472.
55. Cronin P, Joyce SA, O'Toole PW, O'Connor EM. Dietary Fibre Modulates the Gut Microbiota. *Nutrients.* 2021 May 13;13(5):1655. doi: 10.3390/nu13051655. PMID: 34068353; PMCID: PMC8153313.
56. Cheng Z., Zhang L., Yang L., Chu H. The critical role of gut microbiota in obesity. *Front. Endocrinol.* 2022;13:1025706. doi: 10.3389/fendo.2022.1025706.
57. Khalid, S., Arshad, M., Mahmood, S., Ahmed, W., Siddique, F., Khalid, W., Zarlisht, M., Asar, T. O., Hassan, F. A. M., Khalid, S., Arshad, M., Mahmood, S., & Ahmed, W. (2023). Nutritional and phytochemical screening of *Moringa oleifera* leaf powder in aqueous and ethanol extract. *International Journal of Food Properties*, 26(1), 2338–2348. <https://doi.org/10.1080/10942912.2023.2246685>
58. Paikra, B. K., & Gidwani, B. (2017). *Phytochemistry and Pharmacology of Moringa oleifera Lam.* 194–200.
59. Halaby, M. J., & Mcgaha, T. L. (2021). *Amino Acid Transport and Metabolism in Myeloid Function.* 12(August), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.695238>

60. Arthur David, Pawel Rostkowski, (2020). Analytical techniques in metabolomics, *Environmental Metabolomics*, Elsevier, Pages 35-64, ISBN 9780128181966, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818196-6.00002-9>.
61. Krisanits, B., Randise, J. F., Burton, C. E., Findlay, V. J., & Turner, D. P. (2020). Pubertal mammary development as a “ susceptibility window ” for breast cancer disparity. In *Cancer Health Equity Research* (1st ed., Vol. 146). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2020.01.004>
62. Schölmerich, J., & Bollheimer, L. C. (2002). *Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molekular effects of different fat types*. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01909>
63. Bhalla, N., Ingle, N., Patri, S. V, & Haranath, D. (2021). Saudi Journal of Biological Sciences Phytochemical analysis of Moringa Oleifera leaves extracts by GC-MS and free radical scavenging potency for industrial applications. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(12), 6915–6928. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.07.075>
64. Smith, JB., Mangkoewidjojo, S. *Pemeliharaan, Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis*. Jakarta: Universitas Indonesia; 1988 : 37-47
65. Walker, J. M., Dixit, S., Saulsberry, A. C., May, J. M., & Harrison, F. E. (2017). Reversal of high fat diet-induced obesity improves glucose tolerance, inflammatory response, β -amyloid accumulation and cognitive decline in the APP/PSEN1 mouse model of Alzheimer’s disease. *Neurobiology of Disease*, 100, 87–98. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.01.004>
66. Farmakope Herbal Indonesia. 2017. *Edisi II. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia*
67. Bhalla, N., Ingle, N., Patri, S. V, & Haranath, D. (2021). Saudi Journal of Biological Sciences Phytochemical analysis of Moringa Oleifera leaves extracts by GC-MS and free radical scavenging potency for industrial applications. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(12), 6915–6928. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.07.075>
68. Rauchbach, E., Zeigerman, H., Abu-Halaka, D., & Tirosh, O. (2022). Cholesterol Induces Oxidative Stress, Mitochondrial Damage and Death in Hepatic Stellate Cells to Mitigate Liver Fibrosis in Mice Model of NASH. *Antioxidants*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/antiox11030536>
69. Macáková K, Afonso R, Saso L, Mladěnka P. The influence of alkaloids on oxidative stress and related signaling pathways. *Free Radic Biol Med*. 2019 Apr;134:429-444. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.026. Epub 2019 Jan 29. PMID: 30703480.
70. Gjorgieva Ackova, D., Maksimova, V., Smilkov, K., Buttari, B., Arese, M., & Saso, L. (2023). Alkaloids as Natural NRF2 Inhibitors: Chemoprevention and Cytotoxic Action in Cancer. *Pharmaceuticals*, 16(6), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ph16060850>

71. Kane, S. N., Mishra, A., & Dutta, A. K. (2016). Preface: International Conference on Recent Trends in Physics (ICRTP 2016). *Journal of Physics: Conference Series*, 755(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/755/1/011001>
72. Zheng, H., Xu, Y., Liehn, E. A., & Rusu, M. (2024). Vitamin C as Scavenger of Reactive Oxygen Species during Healing after Myocardial Infarction. *International Journal of Molekular Sciences*, 25(6). <https://doi.org/10.3390/ijms25063114>
73. Zhang, H., & Tsao, R. (2016). Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science*, 8, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.02.002>
74. Sarkies, P. (2023). Evolution beyond DNA: epigenetic drivers for evolutionary change? *BMC Biology*, 21(1), 1–3. <https://doi.org/10.1186/s12915-023-01770-4>
75. Capillary, B., Cells, E., Vitro, I. N., Andela, P. I. C., Osselet, F. A. G., Iller, F. L. M., & Uee, V. A. B. (2008). *P Hysiological Pathway for L Ow D Ensity L Ipoproteins Across the Blood - Brain Barrier : T Ranscytosis Through*. 2(0), 47–52.

