



Efek Pemberian High Fat High Fructose Diet (HFHFD) dan Carbon tetrachloride (CCL₄) Terhadap Kadar Cystatin C Serum

Inez Marsha Gabriella Singgih^{1*}, Ika Yustisia², Arif Santoso³, Aminuddin Aminuddin⁴, Liong Boy Kurniawan⁵, Hasyim Kasim⁶

^{1*} Konsentrasi Studi *Aging ad Regenerative Medicine*, Program Magister Biomedik, Universitas Hasanuddin Makassar, Email: inezgaby@yahoo.com, Tlp : +62811273096

² Departemen Biokimia, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin Makassar, Email: ikayustisia@gmail.com

³ Departemen Pulmonologi dan Kedokteran Respirasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin Makassar, Email: arifs777@gmail.com

⁴ Departemen Ilmu Gizi, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, Makassar, Email: aminuddin@med.unhas.ac.id

⁵ Departemen Ilmu Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, Makassar, Email: liongboykurniawan@yahoo.com

⁶ Departemen Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, Makassar, Email: hasyimkasim@yahoo.com

* Alamat korespondensi: inezgaby@yahoo.com

Diterima: Maret 2021

Direview :Juni 2021

Dimuat: November 2021

ABSTRACT

Excessive consumption of fat and fructose can result in impaired kidney function. High Fat High Fructose Diet (HFHFD) is a diet high in fat and beverages or food containing fructose. Administration of carbon tetrachloride in rats will damage the kidneys. Cystatin C is a test to detect early disturbances in kidney function. This study aimed to determine the effect of HFHFD and CCl₄ injection on serum Cystatin C levels in rats. As many as 24 male Wistar rats were grouped into a group of rats given standard feed, a group of rats given a high-fat diet and added fructose to their drinking water, a group of rats given a high-fat diet and added fructose to their drinking water and were injected with CCl₄ twice a week, and a group of rats given standard feed and injected with CCl₄ twice a week. The treatment was given for eight weeks. The parameters tested were serum Cystatin C levels in rats given standard feed compared to rats given a diet high in fat and added fructose in drinking water (HFHFD), rats given HFHFD and CCl₄ injections twice a week, and rats given standard feed and injected CCl₄ twice a week. The results showed that rats given HFHFD and CCl₄ had the highest increase of serum Cystatin C compared to rats given HFHFD only, rats given CCl₄ injections only with standard feed, and those given standard feed. The administration of HFFFD + CCl₄ showed a statistically significant difference in Cystatin C compared to that in the control group (p=0.004). In short, the administration of HFHFD and CCl₄ increases serum Cystatin C levels in rats.

Keywords: Cystatin C, High Fat, High Fructose, Carbon tetrachloride

ABSTRAK

Tingkat konsumsi lemak dan fruktosa tinggi dapat mengakibatkan gangguan fungsi ginjal. High Fat High Fructose Diet (HFHFD) / Diet tinggi lemak tinggi fruktosa merupakan pemberian diet tinggi lemak dan diberikan fruktosa dalam air minum atau dalam makanan. Pemberian Karbon tetraklorida pada tikus menyebabkan kerusakan pada ginjal. Cystatin C merupakan pemeriksaan untuk mengetahui gangguan dini pada fungsi ginjal. Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian HFHFD dan injeksi CCl₄ terhadap kadar cystatin C serum pada tikus. Penelitian ini terdiri dari 4 kelompok yang terdiri dari: 1) kelompok tikus diberi pakan standar; 2) kelompok tikus HFHFD; 3) kelompok tikus HFHFD yang diinjeksi CCl₄ intraperitoneal (IP) dua kali seminggu; dan 4) kelompok tikus yang diberikan pakan standar dan diinjeksi CCl₄ IP dua kali seminggu, dengan 24 ekor tikus. Perlakuan diberikan selama 8 minggu. Parameter yang diuji yakni kadar Cystatin C serum pada tikus yang diberikan pakan standar dibandingkan dengan tikus yang diberikan diet tinggi lemak dan tambahan fruktosa pada air minumnya (HFHFD), tikus yang diberi HFHFD dan suntikan CCl₄ dua kali seminggu, dan tikus dengan pakan standar dan diinjeksi CCl₄ dua kali seminggu. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tikus yang diberikan HFHFD dan CCl₄ mengalami peningkatan Cystatin C serum paling tinggi dibandingkan dengan tikus yang diberikan HFHFD saja, suntikan CCl₄ saja dengan pakan standar, dan yang hanya diberikan pakan standar. Pemberian kombinasi HFHFD + CCl₄ menunjukkan perbedaan Cystatin C yang bermakna secara statistik dibandingkan dengan kelompok kontrol (p=0.004). Simpulan diperoleh bahwa pemberian HFHFD dan CCl₄ meningkatkan kadar Cystatin C serum pada tikus.

Kata kunci: HFHFD , Cystatin C, Tinggi Lemak, Tinggi Fruktosa, Karbon teraklorida

PENDAHULUAN

Terdapat beberapa terminologi yang berhubungan dengan gangguan fungsi ginjal, antara lain sebagai berikut. Insufisiensi ginjal adalah penurunan fungsi ginjal tetapi belum diikuti oleh kadar serum biokimia abnormal. Gagal ginjal adalah gangguan fungsi ginjal yang disertai oleh hasil pemeriksaan serum biokimia abnormal. Anuria adalah produksi urin kurang dari 50 ml sehari. Oliguria adalah pengeluaran urin antara 50-400 ml perhari. Poliuria merupakan produksi urin lebih dari 2,5 liter perhari. Semua nilai ini berlaku untuk individu dengan luas permukaan tubuh 1,73 meter persegi. Nekrosis tubular akut adalah salah satu jenis GGA (Gagal Ginjal Akut) renal (parenkim).

Acute Kidney Injury (AKI) merupakan penurunan fungsi ginjal dalam mengatur keseimbangan komposisi cairan dan elektrolit tubuh, serta ekskresi produk sisa metabolisme, yang terjadi

secara tiba-tiba.[1] *Acute Kidney Injury* (AKI) adalah penurunan cepat (dalam jam hingga minggu) laju filtrasi glomerulus (LFG) yang umumnya berlangsung reversibel, diikuti kegagalan ginjal untuk mengekskresi sisa metabolisme nitrogen, dengan atau tanpa gangguan keseimbangan cairan dan elektrolit.

Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) yang beranggotakan para nefrolog dan intensivis di Amerika pada tahun 2002 sepakat mengganti istilah ARF menjadi AKI. Penggantian istilah renal menjadi *kidney* diharapkan dapat membantu pemahaman masyarakat awam, sedangkan penggantian istilah *failure* menjadi *injury* dianggap lebih tepat menggambarkan patologi gangguan ginjal. Fruktosa memperburuk metabolisme glukosa dan lipid, mengakibatkan peningkatan deposisi jaringan adiposa viseral, akumulasi

trigliserida hati dan resistensi insulin, sehingga penggunaan gabungan diet tinggi lemak dan fruktosa diusulkan.[2]

High Fat High Fructose Diet (HFHFD) / Diet Tinggi Lemak Tinggi

Tikus diketahui merupakan model hewan coba yang ideal dalam menginduksi obesitas dan melihat pengaruhnya terhadap morbiditas. Obesitas yang diinduksi dengan asupan tinggi lemak memberikan gambaran metabolik dan abnormalitas kardiovaskuler seperti yang dialami pasien dengan obesitas dan atau sindroma metabolik.[3] Mencit dan tikus paling sering digunakan dalam pemodelan NAFLD. Strain C57BL / 6 pada mencit dan strain Wistar dan Sprague Dawley pada tikus umumnya lebih disukai karena kecenderungan intrinsik mereka untuk berkembang menjadi obesitas, DM2 dan NAFLD.[4][5]

Fruktosa memperburuk metabolisme glukosa dan lipid, mengakibatkan peningkatan deposisi jaringan adiposa visceral, akumulasi trigliserida hati dan resistensi insulin, sehingga penggunaan gabungan diet tinggi lemak dan fruktosa diusulkan.[6] Fruktosa dapat ditambahkan ke dalam air minum saat hewan diberi makan HFD atau dapat dimasukkan ke dalam makanan. Sellmann dkk. membandingkan diet tinggi lemak, tinggi fruktosa (HFHFD) dengan HFD saja. Setelah 8 minggu, tikus yang diberi HFHFD menunjukkan pertambahan berat badan yang lebih besar dan steatosis lebih jelas dibandingkan dengan dua kelompok lainnya. Setelah 16 minggu, kelompok HFHFD menunjukkan tanda-tanda peradangan hati, yang tidak diamati pada kelompok lain.[7]

Karbon tetraklorida (CCl₄) merupakan xenobiotik yang lazim digunakan untuk Oleh karena itu, ditemukan cystatin-C didalam urin dapat digunakan sebagai penanda kerusakan dari sel epitel tubulus proksimal ginjal. Pembentukan cystatin-

Fruktosa merupakan pemberian diet tinggi lemak dan diberikan fruktosa dalam air minum atau dalam makanan.

menginduksi peroksidasi lipid dan keracunan.[8] Dalam endoplasmik retikulum hati, karbon tetraklorida dimetabolisme oleh sitokrom P450 2E1 (CYP2E1) yang menjadi radikal bebas triklorometil, selanjutnya triklorometilperoksi menyebabkan peroksidasi lipid sehingga mengganggu homeostatis Ca²⁺, dan akhirnya menyebabkan kematian sel[9]

Senyawa CCl₄ diketahui sebagai bahan kimia yang dapat menyebabkan hepatotoksik dan nefrotoksik. CCl₄ diaktifkan di hepar menjadi *trichloromethyl* (CCl₃*) dan radikal *trichloromethyl peroxy* (CCl₃O₂*) yang menginisiasi terjadinya peroksidasi lipid pada fosfolipid membran sel dan menyebabkan perubahan fungsional serta morfologi membran sel, menyebabkan akumulasi *lipid-derived oxidant* sehingga terjadi kerusakan hepar.[10] Penelitian secara *in vitro* dan *in vivo* menyatakan bahwa CCl₄ mempercepat peroksidasi lipid, mengurangi NADPH sitokrom P450 renal, dan mengurangi rasio glutation (GSH/GSSG) pada korteks ginjal seperti halnya pada mikrosomal dan mitokondria ginjal.[11] Selanjutnya, jika terjadi kerusakan ginjal yang parah, maka akan terjadi kenaikan kreatinin serum, level BUN (*blood urea nitrogen*) dan penurunan klirens kreatinin dan ureum.[12]

Cystatin C saat ini sedang dikembangkan sebagai pengganti serum kreatinin untuk memprediksi laju filtrasi glomerulus. Setelah difiltrasi, cystatin-C direabsorpsi seluruhnya dan dikatabolisme oleh sel epitel tubulus. C tidak terlalu bervariasi antara satu individu ke individu lainnya bila dibandingkan dengan kreatinin. Laju produksi cystatin-C tidak dipengaruhi

oleh faktor massa otot, jenis kelamin dan juga ras. Dari beberapa penelitian didapatkan inflamasi, jaringan lemak, penyakit tiroid, keganasan tertentu dan penggunaan kortikosteroid dapat meningkatkan kadar cystatin-C.

Studi lebih lanjut mengenai efek pemberian diet tinggi lemak tinggi fruktosa dan injeksi CCl₄ terhadap terjadinya gangguan awal pada fungsi ginjal dengan pemeriksaan cystatin c pada serum tikus wistar sangat diperlukan.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian diet tinggi lemak tinggi fruktosa dan injeksi CCl₄ terhadap Cystatin C pada serum tikus wistar sebagai parameter gangguan awal pada fungsi ginjal.

Manfaat yang diharapkan adalah hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai acuan untuk penelitian lebih lanjut tentang peranan Cystatin C sebagai penanda gangguan awal pada fungsi ginjal.

METODE PENELITIAN

Rancangan/Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental terhadap tikus coba (*Wistar rats*) dengan desain *post-test with control group design*. Tikus Wistar akan dibagi ke dalam 4 kelompok secara random yaitu kelompok A (n=6) tikus diberi pakan tinggi lemak tinggi fruktosa, kelompok B (n=6) tikus diberi pakan tinggi lemak tinggi fruktosa dan diberikan injeksi CCl₄ seminggu dua kali, kelompok C (n=6) tikus diberi pakan standar, kelompok D (n=6) tikus diberi pakan standar dan diberikan injeksi CCl₄ seminggu dua kali. Sebelum penelitian dimulai, semua kelompok diaklimatisasi terlebih dahulu selama 7 hari. Penelitian dilakukan selama 8 minggu.

Diet tinggi lemak dan tinggi fruktosa mengandung lemak 40,69%, 11,74% protein, 31,98% karbohidrat,

4,53% serat, 0,63% fosfor, 0,36% kalsium dan 20% fruktosa yang diberikan pada air minum. Komposisi diet tinggi lemak terdiri dari jagung, dedak, tepung rese, bungkil kelapa, tallow, minyak kelapa, tepung terigu dan biji kedelai. Makanan diberikan dalam bentuk pelet. Pemberian CCl₄ dengan konsentrasi 0,08 ml/kg dicampur dalam minyak jagung diberikan secara intraperitoneal selama dua kali seminggu.[13] Berat badan tikus ditimbang pada awal dan akhir penelitian.

Setelah 8 minggu, dilakukan pemeriksaan serum Cystatin C dengan metode ELISA. Darah diambil dari ekor tikus pada keempat kelompok dan dilakukan sentrifugasi untuk mendapatkan serum yang akan diperiksa.

Sumber Data

Penelitian ini dilakukan di Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar. Pemeliharaan hewan dan pengambilan sampel darah dilakukan di Laboratorium Entomologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar. Pengamatan dan pemeriksaan kadar Cystatin C dengan menggunakan metode *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) di unit penelitian Laboratorium HUMRC Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin Makassar. Pemeriksaan histopatologi hepar dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi RSPTN UNHAS.

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Januari – Maret 2021.

Sasaran Penelitian

Sampel penelitian ini adalah tikus wistar jantan (*rattus norvegicus*) yang diperoleh dari *breeder rats* di Makassar, Sulawesi Selatan. Besar sampel minimal dalam penelitian ini diperoleh berdasarkan rumus besar sampel untuk penelitian eksperimen dari Federer, yaitu: $(t-1)(n-1) \geq 15$, dan didapatkan hasil 24 tikus.

Sampel dibagi dalam 4 kelompok secara random.

Variabel	Jumlah (N)	Persentase (%)
KATEGORI		
• HFHFD (A)	6	25
• HFHFD + CCl4 (B)	6	25
• CCl4 (C)	6	25
• Kontrol (D)	6	25

Kriteria inklusi untuk sampel penelitian ini adalah tikus wistar jantan, umur 8-12 minggu, berat 180-250 gram, selama adaptasi 7 hari tidak sakit, aktivitas dan tingkah laku normal.

Kriteria *drop-out* sampel adalah selama adaptasi 7 hari tikus tampak sakit (gerakan tidak aktif), tikus mati selama eksperimen berlangsung.

Pengembangan Instrumen dan Teknik Pengumpulan Data

Setelah dilakukan perlakuan penelitian selama 8 minggu, semua kelompok tikus dianastesi menggunakan eter dan diambil darahnya sebanyak 1 ml melalui ekor. Darah dimasukkan ke dalam tabung sampel dan segera dilakukan sentrifugasi untuk mendapatkan serum yang akan diperiksa kadar Cystatin C menggunakan metode ELISA.

Teknik Analisis Data

Hasil pengukuran akan dianalisis menggunakan program SPSS. Data yang diperoleh akan dianalisis statistik menggunakan metode uji ANOVA (*Analysis Of Variance*) bila data terdistribusi normal dan uji Kruskal Wallis bila data tidak berdistribusi

normal. Dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok. Semua tindakan sudah mendapatkan rekomendasi persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin (No. 77 / UN4.6.4.5.31 / PP36 / 2021).

HASIL PENELITIAN

Kadar Cystatin C pada Tikus

Cystatin C adalah protein yang diproduksi oleh sel-sel dalam tubuh. Ketika ginjal bekerja dengan baik, ginjal dapat menjaga kadar Cystatin C dalam darah secara tepat. Jika tingkat Cystatin C dalam darah terlalu tinggi menandakan ginjal tidak berfungsi dengan baik.

Sinyal cystatin C yang dihasilkan sebanding dengan jumlah analit cystatin C yang terikat dengan antibodi dan intensitasnya, Cystatin C yang merupakan keluarga dari gen cystatin tipe 2 merupakan inhibitor yang potensial terhadap proteinase lisosomal yang diekspresikan di beberapa organ tubuh serta merupakan inhibitor ekstraseluler yang penting dari protease sistein. Sebagai salah satu inhibitor protease sistein, cystatin C memiliki peran penting dalam regulasi aktivitas enzim tersebut

TABEL 1. Hubungan Kadar Cystatin C Pasca Intervensi Kelompok Intervensi terhadap Kontrol

Kelompok Intervensi	Cystatin C	P Value
---------------------	------------	---------

	(Mean ± SD)	
Kontrol	17.16 ± 3.1	
HFHFD	25.3 ± 2.3	
HFHFD +CC14	48.5 ± 6.5	0.122*
CC14	34.6 ± 1.6	

*Kruskal Wallis

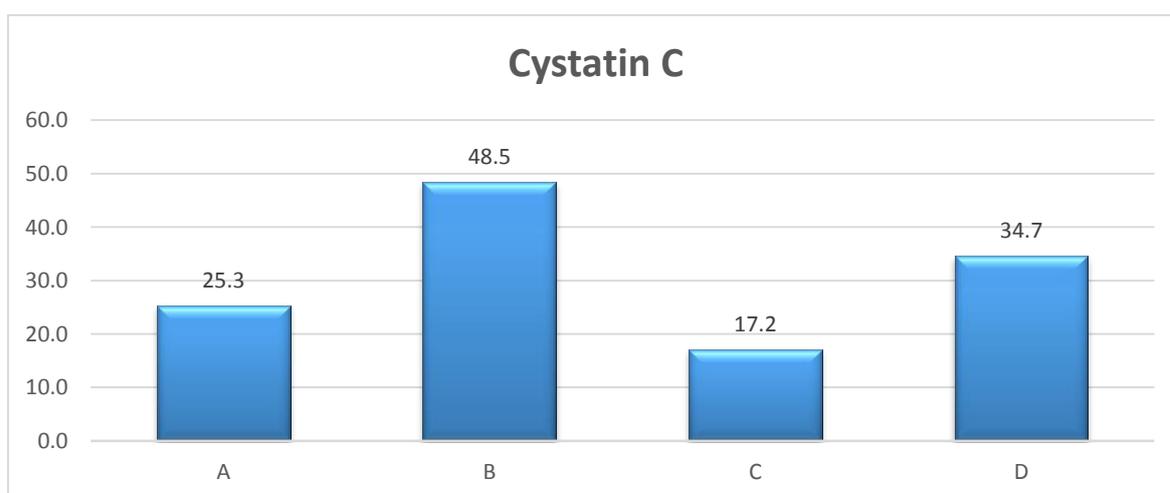
TABEL 2. Hubungan Kadar Cystatin C Pasca Intervensi Kelompok Intervensi terhadap Kontrol

Kelompok Intervensi	Cystatin C (Mean ± SD)	P Value
Kontrol	17.16 ± 3.1	
HFHFD	25.3 ± 2.3	0.336*
HFHFD +CC14	48.5 ± 6.5	0.004*
CC14	34.6 ± 1.6	0.467*

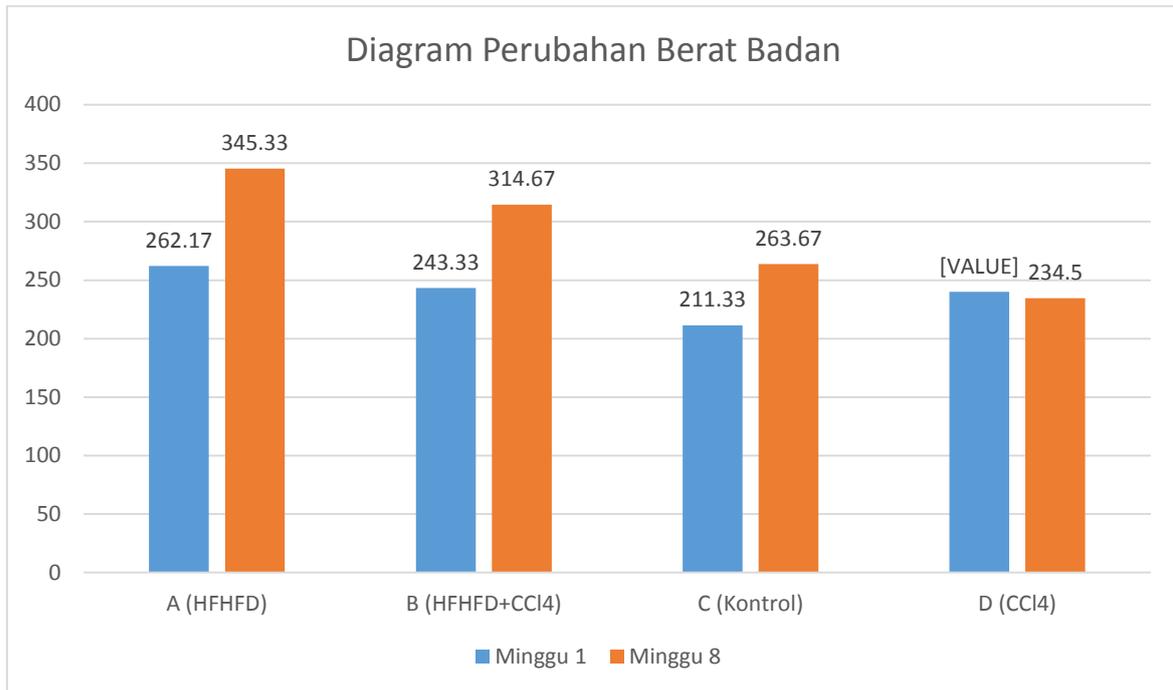
*Mann Whitney

Berdasarkan hasil Uji statistik SPSS 25 mendapatkan uji normalitas shapiro wilk data tidak terdistribusi secara normal dan untuk uji *Kruskal Wallis* mendapatkan hasil $P > 0,05$ sehingga diketahui tidak ada perbedaan signifikan Cystatin C antarkelompok perlakuan. Pada tabel 2 analisis dilanjutkan untuk menilai perbedaan yang spesifik antara kelompok kontrol dan kelompok yang dilakukan intervensi tertentu. Hasil analisis menunjukkan

bahwa rata-rata kadar Cystatin C kelompok yang diberikan intervensi lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol. Dengan kadar rata-rata paling tinggi pada kelompok intervensi dengan kombinasi HFHFD+CC14 sebesar 48.5 ± 6.5 ng/ml. Dari ketiga bentuk intervensi dilakukan, pemberian kombinasi HFHFD + CC14 menunjukkan perbedaan Cystatin C yang bermakna secara statistik dibandingkan dengan kelompok kontrol.



Pada Hasil grafik di atas, setelah 8 minggu, dilakukan pemeriksaan serum Cystatin C dengan metode ELISA. Pada kelompok diatas dinyatakan kadar cystatin C pada kelompok D paling tinggi di antara kelompok A, B, dan C.



Gambar 2. Diagram Perubahan Berat badan

Gambar diatas merupakan perbandingan berat badan tikus selama 8 minggu hasilnya kelompok A, B, dan C tikus mengalami kenaikan berat badan , sedangkan pada kelompok D menunjukkan tren sebaliknya

PEMBAHASAN

Berdasarkan tabel rata-rata asupan pada tikus wistar di atas pada kelompok A,B,C dan D dengan menggunakan uji Kruskal Wallis didapatkan hasil yang menunjukkan bahwa berdasarkan hasil

Uji statistik SPSS 25 mendapatkan uji normalitas shapiro wilk data tidak terdistribusi secara normal dan untuk Kruskal Wallis mendapatkan hasil $P > 0,05$ sehingga diketahui tidak ada perbedaan Cystatin C signifikan antarkelompok intervensi. Analisis dilanjutkan untuk menilai perbedaan yang spesifik antara kelompok kontrol dan kelompok yang dilakukan intervensi tertentu. Hasil analisis menunjukkan bahwa rata-rata kadar Cystatin C kelompok yang diberikan intervensi lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol. Dengan kadar rata-rata paling tinggi pada kelompok intervensi dengan kombinasi HFHFD+CCI4 sebesar 48.5 ± 6.5 ng/ml.

Dari ketiga bentuk intervensi dilakukan, pemberian kombinasi HFHFD + CCI4 menunjukkan perbedaan Cystatin C yang bermakna secara statistik dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Dua puluh empat ekor tikus dibagi dalam 4 kelompok secara random dengan jumlah yang sama ($n = 6$) pada setiap kelompoknya. Kelompok A adalah kelompok tikus coba yang diberi HFHFD ($n=6$) yang diterminasi pada minggu ke-8. Kelompok B adalah kelompok tikus coba yang diberi HFHFD dengan kombinasi injeksi CCI4 peritoneal seminggu dua kali ($n=6$). Kelompok C adalah kelompok tikus coba yang diberi pakan standar sebagai kelompok kontrol ($n=6$). Kelompok D adalah kelompok tikus coba yang diberi pakan standar dengan injeksi CCI4 peritoneal seminggu dua kali. Kenaikan berat badan terjadi pada kelompok A, B, dan C, sedangkan pada kelompok D yaitu tikus coba dengan pakan standar dan injeksi CCI4

seminggu dua kali menunjukkan tren yang sebaliknya.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil yang di dapatkan bahwa terdapat tidak terdapat perbedaan kadar Cystatin C signifikan antarkelompok A, B, C, dan D. Nilai Cystatin C paling tinggi pada kelompok perlakuan B yaitu kelompok dengan asupan HFHFD yang dikombinasi dengan injeksi CCl₄ seminggu dua kali, diikuti dengan kelompok perlakuan D dengan asupan Van der Voer dan injeksi CCl₄ seminggu dua kali, kelompok perlakuan A dengan asupan HFHFD, dan paling rendah yaitu kelompok kontrol.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tikus yang diberikan kombinasi HFHFD dan CCl₄ mengalami peningkatan Cystatin C serum paling tinggi dibandingkan dengan tikus yang diberikan HFHFD saja, suntikan CCl₄ saja dengan pakan standar, dan yang hanya diberikan pakan standar. Dari ketiga bentuk intervensi dilakukan, pemberian kombinasi HFHFD + CCl₄ menunjukkan perbedaan Cystatin C yang bermakna secara statistik dibandingkan dengan kelompok kontrol (p=0.004). Simpulan diperoleh bahwa pemberian kombinasi HFHFD dan CCl₄ meningkatkan kadar cystatin C serum pada tikus.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Melyda, "Diagnosis dan Tatalaksana Acute Kidney Injury (AKI) pada Syok Septik," *Cdk-259*, 2017.
- [2] Kidney Disease Improving Global Outcomes, "KDIGO Clinical practice guideline for glomerulonephritis," *Kidnet Int. Suppl.*, 2012.
- [3] K. C. McPherson *et al.*, "Impact of obesity as an independent risk factor for the development of renal injury: implications from rat models of obesity," *Am. J. Physiol. Physiol.*, 2019.
- [4] R. Kohli and A. E. Feldstein, "NASH animal models: Are we there yet?," *Journal of Hepatology*. 2011.
- [5] Y. Takahashi, Y. Soejima, and T. Fukusato, "Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis," *World Journal of Gastroenterology*. 2012.
- [6] S. C. L. Sanches, L. N. Z. Ramalho, M. J. Augusto, D. M. Da Silva, and F. S. Ramalho, "Nonalcoholic Steatohepatitis: A Search for Factual Animal Models," *BioMed Research International*. 2015.
- [7] C. Sellmann *et al.*, "Diets rich in fructose, fat or fructose and fat alter intestinal barrier function and lead to the development of nonalcoholic fatty liver disease over time," *J. Nutr. Biochem.*, 2015.
- [8] R. G. P. Panjaitan, E. Handharyani, Chairul, Masriani, Z. Zakiah, and W. Manalu, "Pengaruh Pemberian Karbon Tetraklorida Terhadap Fungsi Hati Dan Ginjal Tikus," *Makara, Kesehat.*, 2007.
- [9] R. Chandramouli, T. K. Kandavel, D. Shanmugasundaram, and T. Ashok Kumar, "Deformation, densification, and corrosion studies of sintered powder metallurgy plain carbon steel preforms," *Mater. Des.*, 2007.
- [10] G. Poli, E. Albano, and M. U. Dianzani, "The role of lipid peroxidation in liver damage," *Chem. Phys. Lipids*, 1987.
- [11] J. Rungby and E. Ernst, "Experimentally Induced Lipid Peroxidation after Exposure to Chromium, Mercury or Silver:

- Interactions with Carbon Tetrachloride,” *Pharmacol. Toxicol.*, 1992.
- [12] S. Adewole, A. Salako, O. Doherty, and T. Naicker, “Effect of melatonin on carbon tetrachloride- induced kidney injury in wistar rats,” *African J. Biomed. Res.*, 2010.
- [13] G. Zhang *et al.*, “Carbon tetrachloride (CCl₄) accelerated development of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)/steatohepatitis (NASH) in MS-NASH mice fed western diet supplemented with fructose (WDF),” *BMC Gastroenterol.*, vol. 20, no. 1, 2020.