

GAMBARAN HISTOPATOLOGI HEPAR MENCIT YANG DIINDUKSI ALOKSAN: PERUBAHAN SETELAH PEMBERIAN EKSTRAK BIJI HIJAU KOPI ACEH GAYO

Valentina Elok Raya Astitu^{1*}, Hikmah Muktamiroh², Erna Harfiani³, Maria Selvester Thadeus⁴

^{1,2,3,4} Fakultas Kedokteran, Universitas Pembangunan Nasional "Veteran" Jakarta

Email Korespondensi : valentinaelokraya@gmail.com

ABSTRACT

The number of people with diabetes mellitus continues to increase every year, so the potential for multi-organ complications also continues to increase. One of these organs is the liver. The green bean extract of Aceh Gayo Arabica coffee contains antioxidant compounds that work as antioxidants, antidiabetics, and hepatoprotectives. The aim of this study is to determine the effect of green bean extract of Aceh Gyo Arabica coffee on the liver histopathology of alloxan-induced mice. There are five groups, i.e., Normal Control Group (A), Positive Control Group (B), Negative Control Group (C), Treatment Group 1 (D) aceh gayo arabica coffee bean extract 0.39 mL/day, and Treatment Group 2 (E) aceh gayo arabica coffee bean extract 0.78 mL/day. Hepatic histopathological data analysis using One Way ANOVA test followed by Bonferroni Post Hoc Test. The results of the treatment group extract dose of 0.78 mL/day (E) with an average score of 2.236 ($P = 0.001$) had the smallest average score and closest to the average score of 1. So it was concluded that the extract dose of 0.78 mL/day effectively affected the improvement of the histopathological picture of the liver of alloxan-induced mice.

Keywords:

Alloxan, Arabika Aceh Gayo, Green Bean Coffee, Diabetes Mellitus, Histopathology Liver

1. Pendahuluan

Diabetes melitus (DM) merupakan penyakit defisiensi bawaan serta didapat dalam produksi insulin oleh pankreas, atau ketidakefektifan insulin yang diproduksi yang mengakibatkan penyakit kronik^[1]. Telah mencatat adanya penderita diabetes melitus sebesar 25% yang mengetahui dirinya menderita diabetes melitus. Pada penduduk berusia lebih dari 15 tahun yang terus mengalami peningkatan dengan prevalensi diabetes melitus di Indonesia sebesar 2% dibandingkan pada tahun 2013 sebesar 1.5%, dan peningkatan data pada pemeriksaan gula darah pada 2013 sebesar 6,9% meningkat menjadi 2018 sebesar 8,5%^[2]. Pengobatan DM merupakan pengobatan seumur hidup dan menahun. Insulin merupakan pengobatan utama untuk DM tipe II pada kondisi tertentu, sehingga, memungkinkan adanya efek samping yang tidak diinginkan seperti hipoglikemik^[3]. Salah satu tanaman alternatif yang sudah diteliti memiliki efek antidiabetes yaitu kopi^[4]. Pada kopi terdapat beberapa senyawa anti oksidan contohnya, flavonoid, polifenol, kafein, kumarin, tokofenol, asam klorogenat, dan proantosianidin. Anti oksidan dalam kopi tersebut dapat membantu tubuh untuk menangkal kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas seperti diabetes, penurunan respon imun dan kanker^[5]. Kandungan senyawa anti oksidan terbesar yang ada pada biji kopi adalah asam klorogenat^[6]. Pada penelitian Farhaty tahun 2017 menyatakan bahwa asam klorogenat pada kopi dapat memberi manfaat yaitu sebagai hepatoprotektif, antipasmolik, antivirus, dan antioksidan^[4]. Pada penelitian Yashin *et al* pada tahun 2013 kopi Aceh Gayo memiliki keutamaan yaitu tingginya kadar antioksidan dalam biji kopinya^[7]. Aloksan adalah bahan kimia yang biasa digunakan untuk hewan penelitian agar terinduksi diabetik sehingga mengakibatkan hewan tersebut hiperglikemik^[8]. Kondisi tersebut

dalam jangka waktu lama mengakibatkan terjadinya perubahan pada gambaran histologi pada hepar sehingga timbul gambaran fibrosis, akumulasi dan degenerasi intraseluler, regenerasi, nekrosis [9].

2. Metode

Bahan uji pada penelitian ini menggunakan adalah mencit jantan (*Mus musculus L*), ekstrak biji kopi hijau arabika Aceh Gayo dari Badan Penelitian Tanaman Obat dan Rempah (Balitro) di Bogor dengan dosis 0,39 ml/dari dan 0,79 ml/hari, aloksan dengan dosis 125 mg/kg, metformin dosis 1,3 mg/kgBB/hari yang dilarutkan oleh larutan pembawa 5% sodium carboxymethylcellulose (CMC-Na) dan pakan tinggi lemak.

2.1. Populasi dan sampel

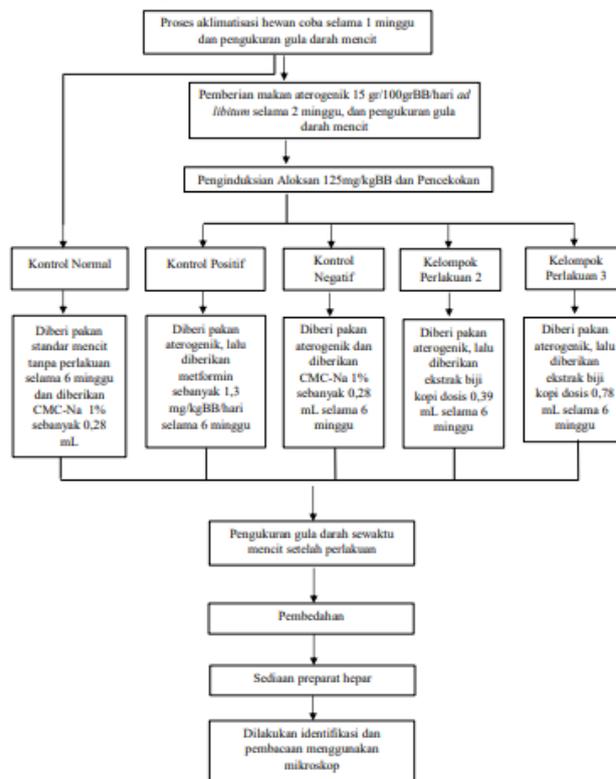
Populasi penelitian ini adalah hewan *Mus musculus L* galur Balb/c dengan jenis kelamin jantan. Jumlah sampel pada penelitian ini 30 ekor, dengan kriteria: berumur 8 minggu, berat badan mencit 20–30 gram, secara anatomi tidak cacat, gula darah dan kolesterol awal dalam batas normal. Mencit dirawat dan dipelihara sesuai dengan prinsip-prinsip penelitian kesehatan menggunakan hewan uji coba di Laboratorium Departemen Farmakologi dan Terapi Rumah Sakit Pendidikan Fakultas Kedokteran Universitas Padjajaran, Bandung.

Ekstrak biji hijau arabika aceh gayo diperoleh dari Oro Coffee Gayo, Aceh sebanyak 1 kg, selanjutnya dilakukan ekstraksi di Badan Penelitian Tanaman Obat dan Rempah (Balitro), Bogor dengan metode maserasi. Hasil ekstraksi biji hijau arabika aceh gayo didapatkan sebanyak 642,5gram atau sebanyak 64,25% dari 1 kg sample biji hijau arabika aceh gayo yang di ekstraksi.

2.2. Pengambilan sampel

Dari 30 mencit yang digunakan, dibagi menjadi 5 kelompok (6 ekor mencit dalam satu kelompok).

2.3. Pengumpulan data dan Prosedur penelitian



Gambar 1. Alur penelitian

Sebelum mulai penelitian, terhadap semua mencit dilakukan proses aklimatisasi. Tahap perlakuan pada mencit dibagi menjadi tiga kelompok kontrol dan dua kelompok perlakuan. Pemberian bahan uji dilakukan *per oral*. Berikutnya, dilakukan pemberian makan ateriogenik 15 gr/100grBB/hari *ad libitum* selama 2 minggu, penginduksian Aloksan 125mg/kgBB, pencekakan dan pengukuran gula darah mencit. Setelah diberikan induksi aloksan, kadar GDS mencit menunjukkan rerata sebagai berikut:

- a) Kontrol normal: 110 ± 9 mg/dl
- b) Kelompok kontrol positif: 194 ± 26 mg/dl
- c) Kelompok kontrol negatif: 234 ± 166 mg/dl
- d) Kelompok perlakuan 1: 321 ± 186 mg/dl
- e) Kelompok perlakuan 2: 288 ± 179 mg/dl

Perlakuan terhadap mencit:

1) Mencit pada kelompok kontrol:

- a) Kontrol normal: diberikan pakan mencit standar *ad libitum* dan dilakukan pencekakan CMC-Na 1% sebanyak 0,28 mL.
- b) Kelompok kontrol positif: diberikan makanan tinggi lemak *ad libitum* selama 6 minggu, diinduksi aloksan 125mg/kgBB, serta diberikan metformin sebanyak 250 mg/kgBB/hari selama 8 minggu
- c) Kelompok kontrol negatif: diberikan pakan mencit tinggi lemak *ad libitum* selama 6 minggu, diinduksi aloksan 125mg/kgBB, serta dilakukan pencekakan CMC-Na 1% sebanyak 0,28 ml.

2) Mencit pada kelompok perlakuan:

- a) Kelompok perlakuan 1: diberikan makanan tinggi lemak *ad libitum* selama 6 minggu serta dilakukan pencekakan dosis ekstrak biji kopi arabika aceh gayo dengan dosis 0,39 ml/hari.
- b) Kelompok perlakuan 2: diberikan makanan tinggi lemak *ad libitum* selama 6 minggu serta dilakukan pencekakan ekstrak biji kopi arabika aceh gayo dengan dosis 0,78 ml/hari.

Total jangka perlakuan pada mencit dilakukan selama 9 minggu. Setelah 9 minggu mencit dibunuh dengan proses eutanasia mencit dengan menggunakan kloroform. Kemudian, dilakukan proses pembedahan dengan laparotomi menggunakan minor set. Setelah itu, diambil organ hepar pada mencit tersebut dan dipotong di dalam cairan fisiologis (NaCl 0,9%). Hal yang perlu diperhatikan sebelum pemotongan jaringan adalah pemberian etiket (nomor dan nama organ) pada wadah jaringan, fiksasi jaringan organ yang kecil menggunakan eosin 1% dan dilakukan pewarnaan engan Hematoksilin dan Eosin.^[10] Penetapan indikator preparat gambaran histopatologi hepar dapat dilihat bagaimana progresifitas dari organ hepar tersebut. Setiap ekor mencit akan dibuatkan satu iris preparat jaringan. Lalu jaringan tersebut akan diamati menggunakan mikroskop dibagi menjadi lima pandang dengan perbesaran mikroskop 400x. Di setiap lapang pandang, akan diamati 20 sel secara acak dan dinilai skor tiap sel hepar dengan model *scor histopatologi Manja Roenigk*. Selanjutnya akan dilakukan penghitungan dengan metode penjumlah sel normal (A), sel degenerasi parenkim (B), degenerasi hidropik (C), dan sel nekrosis (D) pada setiap lapang. Skor Manja Roenigk didapatkan dengan cara $(Ax1) + (Bx2) + (Cx3) + (Dx4)$, selanjutnya hasil penjumlahan tersebut dibagi dengan cara penambahan $(A+B+C+D)$. Setelah diperoleh hasil rata-rata pada suatu kelompok perlakuan maka dari nilai rata-rata pada tiap lapang pandang dibagikan dengan jumlah sampel pada tiap perlakuan. Hasil yang didapatkan: jika semakin mendekati nilai rata-rata 1, maka jumlah sel yang normal semakin banyak. Semakin mendekati angka rata-rata 2, maka jumlah sel yang degenerasi parenkim semakin banyak. Semakin dekat dengan angka rata-rata 3, maka jumlah sel yang degenerasi hidropik semakin banyak. Semakin mendekati angka rata-rata 4, maka jumlah sel yang nekrosis semakin banyak.

Jenis-jenis kerusakan sel hepar yang diamati dan dinilai terdiri dari degenerasi parenkim, degenerasi hidropik dan nekrosis. Kemudian dihitung besarnya sel yang mengalami kerusakan setelah pemberian kontrol positif, kontrol negatif, perlakuan 1 dengan ekstrak biji arabika aceh gayo dosis 0,39 mL/hari dan perlakuan 2 dengan ekstrak biji arabika aceh gayo dosis 0,78 mL/hari.

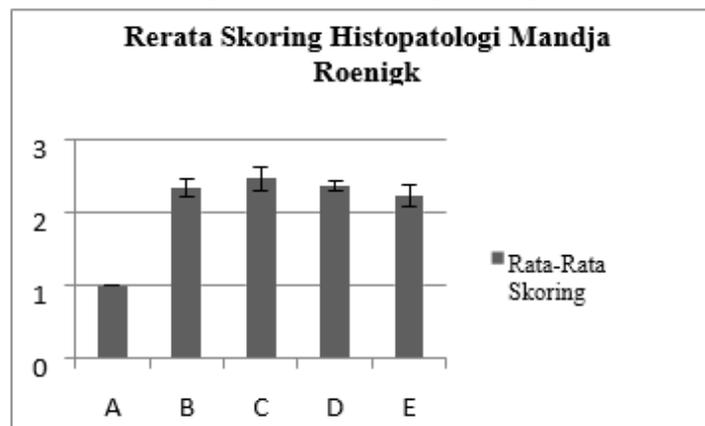
Tabel 1 Kriteria Penilaian Histologi Sel Hepar Menggunakan Skor Manja Roenigk

| Tingkat perubahan | Skor |
|--------------------------|------|
| Normal | 1 |
| Degenerasi parenkimatosa | 2 |
| Degenerasi hidropik | 3 |
| Nekrosis | 4 |

Setiap preparat akan dihitung dengan mengalikan jumlah sel dengan kategori kerusakan sel hepar sehingga didapatkan nilai rerata dengan nilai minimal 100 pada sel hepar normal dan nilai maksimal 400 pada sel hepar nekrosis. Selanjutnya data akan diolah menggunakan program komputer SPSS release 17.

3. Hasil dan pembahasan

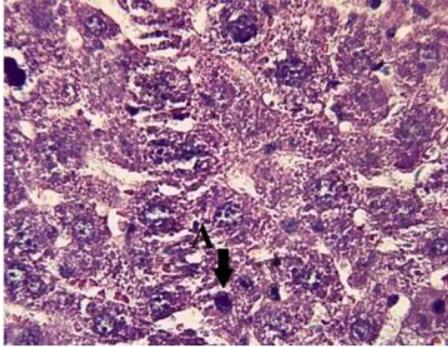
Menurut penelitian Affonso, ekstraksi dari biji kopi hijau arabika dengan metode maserasi serta pelarut air memiliki beberapa komposisi fitokimia alkaloid dan asamfenolik, yaitu asam klorogenat, asam ferulat, asam siringat, asam hidroksibenzoat, asam protokatekuat, trigonelin, kafein serta sedikit kandungan teofili dan asam kafeat [11]. Gunalan *et al.* menyatakan bahwa adanya senyawa fitokimia yang terdapat diekstrak dari tanaman kopi arabika, yaitu flavonoid, tanin, karbohidrat, alkaloid, fenol, amilum, kuinona kumarin, dan fixed sesuai dengan hasil uji fitokimia yang dilakukan Affonso [12]. Hasil pengamatan yang dilakukan menyatakan bahwa dari semua kelompok memiliki perbedaan yang bermakna dengan sel hepar kelompok normal (A) yang berarti kelompok lain telah mengalami kerusakan hepar. Kelompok yang paling mendekati kelompok normal (A) dibandingkan kelompok lain adalah kelompok E, yaitu kelompok dengan perlakuan ekstrak biji kopi arabika Aceh Gayo 0,78 mL/hari, meskipun demikian kedua kelompok tetap memiliki perbedaan yang cukup signifikan. Kelompok kontrol negatif (C) tidak memiliki perbedaan yang bermakna dengan kelompok (B) dan Kelompok (D), dari hasil ini menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna kerusakan hepar mencit pada masing-masing kelompok tersebut. Sedangkan kelompok C memiliki perbedaan yang cukup signifikan dengan kelompok E serta rata-rata skoring kelompok E lebih rendah dibandingkan kelompok C. Kelompok perlakuan D dan E tidak memiliki perbedaan yang signifikan, hal ini menunjukkan kerusakan hepar pada kedua kelompok tidak jauh berbeda walaupun rerata skoring kelompok E lebih rendah.



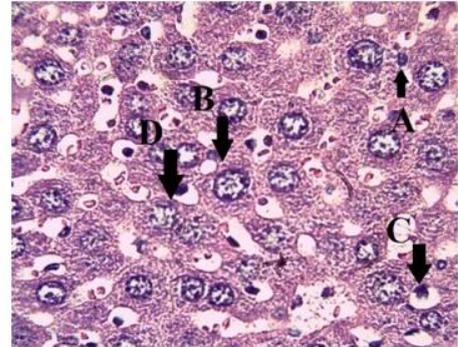
Gambar 2 Rerata Skoring Histopatologi Mandja Roenigk dengan Uji Post Hoc Bonferoni

Hasil penelitian pada gambar 1 menunjukkan bahwa seluruh kelompok perlakuan (kelompok B, C, D dan E) mengalami kerusakan histopatologi hepar. Menggunakan penilaian skoring Manja Roenigk seluruh kelompok perlakuan menunjukkan rerata skor lebih dari 2. Semakin mendekati rata-rata 2, maka jumlah sel yang mengalami degenerasi parenkim semakin banyak dan semakin mendekati rata-rata 3, maka jumlah sel yang mengalami degenerasi hidropik semakin banyak. Dengan demikian hanya kelompok kontrol normal (A) dengan rerata nilai 1 yang menunjukkan gambaran histopatologi yang normal. Kelompok dengan tingkat kerusakan yang paling berat hingga ke ringan secara berurutan adalah Kelompok kontrol negatif (C) dengan skor 2.47, kelompok perlakuan ekstrak dosis 0,39 ml/hari (D) dengan skor 2.373, kemudian kelompok kontrol positif (B) dengan skor 2.343, dan kelompok perlakuan ekstrak dosis 0,78 ml/hari (E) dengan skor 2.236 ($P = 0.001$). Pemberian ekstrak biji kopi arabika Aceh Gayo 0,78 ml/hari (E) merupakan dosis perlakuan yang memberikan efek hepatoprotektif terbaik pada penelitian ini, hal ini dibuktikan dengan hasil uji post hoc yaitu hanya kelompok E yang memiliki perbedaan bermakna dengan kelompok kontrol negatif (C). Hal ini dapat terjadi karena adanya efek antioksidan dan antidiabetes yang dimiliki oleh ekstrak biji kopi hijau arabika Aceh Gayo. Senyawa antioksidan memiliki kemampuan untuk mengambil Reactive Oxygen Species (ROS) secara langsung dengan memberikan satu atom hidrogennya berada dalam bentuk glukosida atau dalam bentuk bebas yang disebut aglikon [13]. Ekstrak biji kopi hijau arabika aceh gayo mengandung berbagai antioksidan yang salah satunya adalah flavonoid [14]. Manfaat flavonoid meliputi: (1) Mensupresi pembentukan ROS dengan inhibisi enzim atau dengan mengkelasi elemen dalam pembentukan radikal bebas; (2) Mengambil ROS secara langsung; (3) Efek *up-regulasi* atau efek proteksi antioksidan [15]. Antidiabetik pada ekstrak biji kopi didapatkan dari kandungan asam klorogenat yang ada didalam biji kopi. Asam klorogenat memiliki efek antidiabetik dengan cara menyebabkan penurunan resistensi insulin, menghambat absorpsi glukosa di saluran cerna, menghambat atau memperlambat hidrolisis glucose-6-phosphatase pada hepatic stage melalui peningkatan fosforilasi AMPK yang mungkin dapat menurunkan output plasma glukosa darah (penurunan glukoneogenesis), dan meningkatkan uptake glukosa dengan meningkatkan ekspresi GLUT 4 melalui peningkatan fosforilasi AMPK [16],[17]. Asam klorogenat mampu menghambat absorpsi glukosa di usus dengan cara meningkatkan level glucagon-like peptide (GLP-1 [15]. Dengan menurunnya kadar glukosa darah maka dapat menurunkan ROS yang terbentuk akibat reaksi non enzimatis karena keadaan hiperglikemia. Hal memberikan manfaat proses kerusakan pada jaringan hepar juga dapat dikurangi. Selain kelompok kontrol normal, seluruh kelompok yang diinduksi aloksan agar menghasilkan kondisi diabetik eksperimental menunjukkan gambaran histopatologi yang tidak normal. Aloksan merusak integritas sel beta Langerhans pankreas yang dapat mengakibatkan menurunnya produksi hormon insulin [18]. Hal tersebut dapat terjadi karena aloksan mempunyai sifat toksik yang selektif terhadap sel β -pankreas. Aloksan mempunyai struktur menyerupai glukosa sehingga aloksan dapat menghambat kerja glukokinase pada sel β -pankreas, selain itu aloksan dapat membentuk spesies radikal bebas melalui reaksi redoks berulang. Aloksan yang terakumulasi di dalam sel β -pankreas akan mengalami reduksi dengan menggunakan glutathion (GSH) dan menghasilkan asam dialurik [19]. Produk reduksinya akan mengalami autooksidasi kembali menjadi aloksan. Akibat dari siklus redoks tersebut, terjadi peningkatan radikal bebas dan penurunan antioksidan yang dapat merusak sel β -pankreas [20]. Pada kondisi diabetik, stress oksidatif terjadi dan secara progresif terus meningkat, hal inilah yang dipercaya berperan krusial dalam patogenesis dari komplikasi diabetes pada jaringan lain. Hepar merupakan organ utama untuk proses detoksifikasi dan oksidatif di tubuh, dan dalam kondisi diabetik biomarker stress oksidatif di hepar meningkat. Stress oksidatif memediasi kerusakan pada hepar yang berujung pada *non-alcoholic steatohepatitis in diabetes and karsinoma hepatoselular*. Stress oksidatif merupakan ketidakseimbangan yang terjadi antara terbentuknya ROS dan kemampuan sel dalam mendetoksifikasi zat tersebut, sehingga pada akhirnya terjadi kerusakan sel. Pada keadaan DM, peningkatan ROS berasal dari banyak penyebab salah satunya dari reaksi berantai respirasi enzimatis, non-enzimatis dan mitokondria. Di sisi lain, ada aktivitas antioksidan tersupresi pada kondisi diabetes yang semakin mendukung meningkatnya stress oksidatif. Peningkatan stress

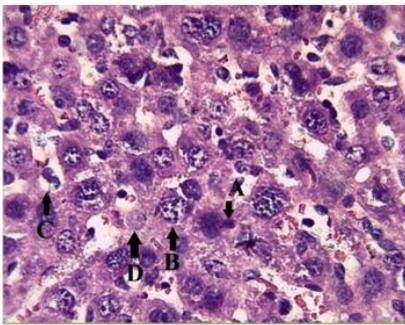
oksidatif menginduksi peroksidasi lipid dan kerusakan membran sel dan membran organel seperti membran mitokondria. Semua ini menyebabkan disfungsi hepatosit dalam proses oksidasi asam lemak bebas sehingga terjadi deposisi trigliserida yang berlebihan di hati atau perlemakan hati [20].



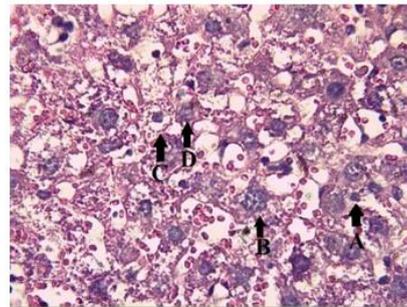
Gambar 1 Gambaran Histopatologi Kelompok Kontrol Normal



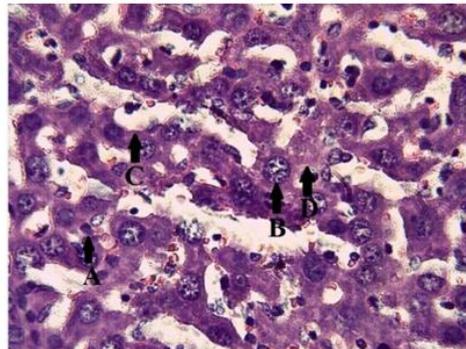
Gambar 2 Gambaran Histopatologi Kelompok Kontrol Positif



Gambar 3 Gambaran Histopatologi Kelompok Kontrol Negatif



Gambar 4. Gambaran Histopatologi Kolompok Kontrol Perlakuan 1



Gambar 5. Gambaran Histopatologi Kelompok Kontrol Perlakuan 2

Keterangan: (A) Menunjukkan sel hepar normal dengan nilai skor 1, (B) menunjukkan sel hepar dengan degenerasi parenkimatososa dengan nilai skor 2, (C) Menunjukkan sel hepar dengan degenerasi hidropik dengan nilai skor 3, dan (D) Menunjukkan sel hepar dengan nekrosis dengan nilai skor 4.

4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, analisis, dan pembahasan yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa pemberian efek dari ekstrak biji hijau kopi arabika aceh gayo terhadap gambaran histopatologi hepar, sebagai berikut:

- 1) Pemberian ekstrak biji hijau kopi memberi pengaruh perbaikan pada gambaran histopatologi hepar mencit yang telah diinduksi aloksan.

- 2) Pada mencit yang diberikan ekstrak biji hijau kopi dengan dosis 0,78 ml/hari atau setara dengan dua cangkir kopi memberi pengaruh perbaikan paling efektif pada gambaran histopatologi hepar mencit yang diinduksi aloksan.

Referensi

- [1]. World Health Organization. Diabetes Mellitus. Published 2019. <https://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs138/en/>
- [2]. Riskesdas. Riset Kesehatan Dasar. Published 2018. Accessed June 20, 2022. https://labdata.litbang.kemkes.go.id/images/download/laporan/RKD/2018/Laporan_Nasional_RKD2018_FINAL.pdf
- [3]. Perkeni. Pengolahan dan Pencegahan Diabetes Melitus tipe 2 diIndonesia. Published 2015. Accessed March 8, 2019. <https://pbperkeni.or.id/wp-content/uploads/2019/01/4.-Konsensus-Pengelolaan-dan-Pencegahan-Diabetes-melitus-tipe-2-di-Indonesia-PERKENI-2015.pdf>
- [4]. Farhaty N, Muchtaridi M. Tinjauan kimia dan aspek farmakologi senyawa asam klorogenat pada biji kopi. *Farmaka*. 2016;14(1):214-227.
- [5]. Harahap MR. Identifikasi daging buah kopi robusta (*Coffea Robusta*) berasal dari provinsi Aceh. *Elkawnie J Islam Sci Technol*. 2017;3(2):201-210.
- [6]. Pristiana DY, Susanti S, Nurwantoro N. Aktivitas Antioksidan Dan Kadar Fenol Berbagai Ekstrak Daun Kopi (*Coffea sp.*): Potensi Aplikasi Bahan Alami Untuk Fortifikasi Pangan. *J Apl Teknol Pangan*. 2017;6(2):89.
- [7]. Yashin A, Yashin Y, Wang JY, Nemzer B. Antioxidant and antiradical activity of coffee. *Antioxidants*. 2013;2(4):230-245.
- [8]. Irdalisa I, Safrida S, Khairil K, Abdullah A, Sabri M. Profil kadar glukosa darah pada tikus setelah penyuntikan aloksan sebagai hewan model hiperglikemik. *J EduBioTrop*. 2015;3(1).
- [9]. Utomo Y, Hidayat A, Dafip M, Sasi FA. Studi histopatologi hati mencit (*Mus musculus L.*) yang diinduksi pemanis buatan. *Indones J Math Nat Sci*. 2012;35(2).
- [10]. FKUI. *Tahap Pembuatan Sediaan Preparat*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2011
- [11]. Affonso RCL, Voytena APL, Fanan S, et al. Phytochemical composition, antioxidant activity, and the effect of the aqueous extract of coffee (*Coffea arabica L.*) bean residual press cake on the skin wound healing. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016
- [12]. Gunalan, G, Myla, N, Balabhaskar, R 2012, 'In vitro Antioxidant Analysis of Selected Coffe Bean Varieties' Vol. 4 No. 4, Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, India
- [13]. Redha, A 2010, 'Flavonoid: struktur, sifat antioksidatif dan perannya dalam sistem biologis', <http://repository.polnep.ac.id/xmlui/handle/123456789/144>.
- [14]. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Sci world J*. 2013;2013.
- [15]. Campos-Florián J, Bardales-Valdivia J, Caruajulca-Guevara L, Cueva-Llanos D. Anti-diabetic effect of *Coffea arabica*, in alloxan-induced diabetic rats. *Emirates J Food Agric*. Published online 2013:772- 777.
- [16]. Yustisiani A, Andari D. Pengaruh pemberian kopi terhadap penurunan kadar glukosa darah pada tikus putih strain wistar diabetes mellitus tipe 2. *Saintika Med*. 2013;9(1):38-45.
- [17]. Ong KW, Hsu A, Tan BKH. Anti-diabetic and anti-lipidemic effects of chlorogenic acid are mediated by ampk activation. *Biochem Pharmacol*. 2013;85(9):1341- 1351.
- [18]. Lenzen S. The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008;51(2):216-226.
- [19]. Ighodaro MO, Adeosun MA, Akinloye OA. ScienceDirect alloxaninduced diabetes, a common model for evaluating the glycemic-control potential of therapeutic compounds and plants extracts in experimental studies. *Medicina (B Aires)*. 2018;53(6):1-10.
- [20]. Kim S-I, Heo W, Lee S-J, Kim Y-J. Isolation and Characterization of Effective Bacteria That Reduce Ammonia Emission from Livestock Manure. *Microorganisms*. 2021;10(1):77