

Biphasic Response and Atherogenic Index Modulation of *Moringa oleifera* Ethanolic Extract in Diet-Induced Obesity Zebrafish Model: A Pharmacological Evaluation

Respons Bifasik dan Modulasi Indeks Aterogenik Ekstrak Etanol *Moringa oleifera* pada Model Zebrafish *Diet-Induced Obesity*: Sebuah Evaluasi Farmakologis

Yhusi Karina Riskawati ^{a*}, Aswaty Nur ^{a*}, Dewi Mustika ^a, Budi Hartono ^b, Grace Meigawati Iwanto ^b, Siluh Putu Chinintya Vania Saraswati ^b, and Christyaji Indradmojo ^c

^aDepartment of Physiology, Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya, Malang, East Java, Indonesia.

^bStudy Program of Medicine, Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya, Malang, East Java, Indonesia.

^cMedical Doctor Profession Program, Medical Faculty, Maulana Malik Ibrahim Islamic State University, Malang, Indonesia.

*Corresponding Authors: yhusi@ub.ac.id, aswatymur@ub.ac.id

Abstract

Background: Obesity-related dyslipidemia is a major cardiovascular risk factor. *Moringa oleifera* is rich in phytosterols and flavonoids with potential hypolipidemic properties. However, its pharmacodynamic profile and dose-dependent responses in *in vivo* models remain incompletely understood, particularly regarding hormetic effects associated with crude extracts. **Objective:** To evaluate the effects of *M. oleifera* leaf ethanol extract on lipid profile modulation and atherogenic index in a *Diet-Induced Obesity* (DIO) zebrafish model. **Methods:** Wild-type female zebrafish were induced with obesity using an *Artemia nauplii* overfeeding protocol (DIO model) and allocated into five groups (n=9-10 per group analysed): non-DIO control, DIO control, DIO + 0.56 ppm extract, DIO + 1.12 ppm extract, and DIO + 2.24 ppm extract. After 40 days, visceral adipose tissue was collected for colorimetric lipid analysis. The atherogenic index (AI) was calculated as a lipoprotein-ratio-based proxy for cardiovascular risk. **Results:** DIO induction significantly increased total cholesterol levels and the atherogenic index. Interestingly, *M. oleifera* extract exhibited a biphasic response. The 0.56 ppm dose significantly restored lipid profiles and reduced the LDL/HDL ratio (AI) to levels approaching those of the non-DIO group (p<0.05), although marked inter-individual variability at this dose warrants cautious interpretation. In contrast, the 1.12 ppm dose failed to improve lipid parameters and instead worsened the atherogenic ratio, tentatively suggesting the presence of a *therapeutic window* and a possible shift toward pro-oxidant/metabolic stress at higher doses. At the highest dose (2.24 ppm), total cholesterol and AI partially recovered relative to the 1.12 ppm dose; this secondary finding was less consistent than the 0.56 ppm response and requires further study before mechanistic interpretation. **Conclusion:** *M. oleifera* ethanol extract demonstrated the most consistent hypolipidemic effect at the lowest dose tested (0.56 ppm) through modulation of the atherogenic index. These findings highlight the importance of dose standardization and further toxicological and phytochemical characterization in phytopharmaceutical development to avoid paradoxical effects and maximize therapeutic efficacy.

Keywords: *Moringa oleifera*; obesity; zebrafish; cholesterol; lipid profile.

Abstrak

Latar Belakang: Dislipidemia terkait obesitas merupakan faktor risiko utama kardiovaskular. *Moringa oleifera* kaya akan fitosterol dan flavonoid yang berpotensi sebagai agen hipolipidemik. Namun, profil farmakodinamik dan respons bergantung-dosis (*dose-dependent*) pada model *in vivo* masih belum sepenuhnya dipahami, terutama terkait fenomena *hormesis* pada ekstrak kasar. **Tujuan:** Mengevaluasi efek modulasi profil lipid dan indeks aterogenik ekstrak etanol daun *M. oleifera* pada zebrafish model *Diet-Induced Obesity* (DIO). **Metode:** Zebrafish betina *wild-type* diinduksi obesitas melalui protokol *overfeeding Artemia nauplii* (model DIO) dan dialokasikan ke dalam lima kelompok (n=9-10 per kelompok pada analisis akhir): kontrol non-DIO, kontrol DIO, DIO + ekstrak 0,56 ppm, DIO + ekstrak 1,12 ppm, dan DIO + ekstrak 2,24 ppm. Setelah 40 hari, jaringan adiposa visceral diekstraksi untuk analisis kolorimetrik lipid. Indeks aterogenik (AI) dihitung sebagai proksi risiko kardiovaskular berbasis rasio lipoprotein. **Hasil:** Induksi DIO secara signifikan meningkatkan kolesterol total dan indeks aterogenik. Menariknya, ekstrak *M. oleifera* menunjukkan respons bifasik. Dosis 0,56 ppm secara signifikan merestorasi profil lipid dan menurunkan rasio LDL/HDL (AI) mendekati kelompok non-DIO (p<0,05), meskipun variabilitas antar-individu yang cukup besar pada dosis ini perlu diinterpretasi secara hati-hati. Sebaliknya, dosis 1,12 ppm gagal memperbaiki profil lipid dan justru memperburuk rasio aterogenik, yang secara tentatif mengindikasikan adanya batas terapeutik (*therapeutic window*) dan kemungkinan pergeseran ke arah pro-oksidan/stres metabolik pada dosis lebih tinggi. Pada dosis tertinggi (2,24 ppm), kolesterol total dan AI menunjukkan pemulihan parsial dibandingkan dosis 1,12 ppm; temuan sekunder ini kurang konsisten dibandingkan respons pada dosis 0,56 ppm dan memerlukan penelitian lebih lanjut sebelum diinterpretasikan secara mekanistik. **Kesimpulan:** Ekstrak etanol *M. oleifera* menunjukkan efek hipolipidemik yang paling konsisten pada dosis terendah yang diuji (0,56 ppm) melalui modulasi indeks aterogenik. Temuan ini menyoroti pentingnya standarisasi dosis serta karakterisasi toksikologis dan fitokimia lebih lanjut pada pengembangan fitofarmaka untuk menghindari efek paradoksikal.

Kata Kunci: *Moringa oleifera*; obesitas; zebrafish; kolesterol; profil lipid.



Copyright © 2020 The author(s). You are free to : **Share** (copy and redistribute the material in any medium or format) and **Adapt** (remix, transform, and build upon the material) under the following terms: **Attribution** — You must give appropriate credit, provide a link to the license, and indicate if changes were made. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggests the licensor endorses you or your use; **NonCommercial** — You may not use the material for commercial purposes; **ShareAlike** — If you remix, transform, or build upon the material, you must distribute your contributions under the same license as the original. Content from this work may be used under the terms of the a [Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International \(CC BY-NC-SA 4.0\) License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

<https://doi.org/10.36490/journal-jps.com.v9i3.1804>

Article History:

Received: 13/06/2026,
Revised: 13/08/2026,
Accepted: 14/08/2026,
Available Online: 15/08/2026.

QR access this Article



Pendahuluan

Pada tahun 2016, lebih dari 1,9 miliar orang dewasa mengalami kelebihan berat badan, dan 650 juta di antaranya mengalami obesitas [1]. Di Indonesia, tren ini juga menunjukkan peningkatan yang signifikan; hasil RISKESDAS mencatat prevalensi obesitas pada laki-laki dewasa meningkat dari 13,9% pada tahun 2007 menjadi 19,7% pada tahun 2013, sementara pada perempuan dewasa melonjak dari 14,8% menjadi 32,9% [2]. Meningkatnya prevalensi kegemukan dan obesitas tersebut sangat berkaitan dengan perubahan pola asupan makan. Konsumsi yang mengarah pada peningkatan asupan makanan padat energi namun rendah nutrisi, dengan kadar gula dan lemak jenuh yang tinggi, dikombinasikan dengan kurangnya aktivitas fisik, berdampak langsung pada patogenesis obesitas [1]. Obesitas ditandai dengan peningkatan massa jaringan adiposa yang merupakan hasil dari hiperplasia dan hipertrofi sel lemak [3], di mana jumlah sel lemak ditentukan secara mayor oleh proses diferensiasi adiposit (adipogenesis) [3].

Untuk mengatasi permasalahan metabolik ini, berbagai produk alami berupa ekstrak kasar maupun komponen bioaktif dari tanaman telah dieksplorasi karena kemampuannya dalam menginduksi penurunan berat badan dan mencegah obesitas [4]. Komponen bioaktif yang dimaksud adalah polifenol, yakni flavonoid yang menunjukkan aktivitas antiobesitas yang kuat seperti kaempferol, genistein, katekin, dan kuersetin [4–7]. Salah satu tanaman yang memiliki efek positif dan potensial untuk mengatasi permasalahan obesitas adalah kelor (*Moringa oleifera*) [8–10]. Menurut Gopalakrishnan [11], 100 gram bubuk kelor mengandung 205 kalori, 27,1 gram protein, 2,3 gram lemak, 38,2 gram karbohidrat, dan 19,2 gram serat, sehingga kelor juga kerap dimanfaatkan untuk mengatasi malnutrisi [12]. Daun kelor memiliki berbagai kandungan yang mencegah terjadinya obesitas seperti β -sitosterol (90 mg/g), fenol (8 μ g/mL), dan komponen flavonoid (27 μ g/mL) seperti kaempferol dan kuersetin [13, 14, 16]. Kuersetin dan fenol berperan sebagai agen antiobesitas dengan cara menghambat peroksidasi lipid dan bertindak sebagai inhibitor enzim *Pancreatic Lipase* (PL) [17–19]. Lebih lanjut, kuersetin meningkatkan fosforilasi AMPK beserta substratnya Acetyl-CoA carboxylase dan memicu apoptosis pada adiposit matur 3T3-L1 [7], sedangkan ekstrak kaya kuersetin menekan diferensiasi preadiposit 3T3-L1 disertai penurunan ekspresi PPAR γ dan C/EBP α [20]. Selain kuersetin, terdapat β -sitosterol, sebuah senyawa fitosterol yang memiliki struktur homolog dengan kolesterol mamalia. Karena kemiripan struktural ini, β -sitosterol mampu berkompetisi dengan kolesterol diet untuk inkorporasi ke dalam misel empedu di usus dan berikatan dengan transporter intestinal *Niemann-Pick C1-Like 1* (NPC1L1), yang merupakan target farmakologis yang sama dengan obat penurun kolesterol ezetimibe [21, 30–32].

Untuk mengevaluasi potensi farmakologis tersebut secara *in vivo*, zebrafish (*Danio rerio*) digunakan sebagai model penyakit metabolik. Zebrafish merupakan teleostei berukuran kecil yang berperan besar sebagai model penyakit pada manusia karena metabolisme lipidnya yang sangat mirip dengan vertebrata tingkat tinggi. Hewan ini memfasilitasi studi mengenai absorpsi usus dengan produksi empedu di hepar, transport lemak dan kolesterol dengan lipoprotein, β -oksidasi, serta penyimpanan trigliserida (TG) di jaringan viseral, subkutan, dan intramuskular [22–25]. Berbagai gen yang terlibat dalam adipogenesis, transport lipid, dan homeostasis kolesterol pada zebrafish memiliki konservasi jalur genetik yang kuat dengan manusia. Oleh karena itu, model *Diet-Induced Obesity* (DIO) pada zebrafish dianggap mampu memberikan gambaran awal yang valid mengenai potensi terapeutik suatu senyawa dalam memperbaiki gangguan metabolisme lipid dan memprediksi risiko kardiovaskular [23, 25, 32].

Meskipun potensi *M. oleifera* telah banyak dilaporkan, tantangan utama dalam farmakologi bahan alam yang sering diabaikan adalah fenomena *hormesis* atau respons bifasik. Ekstrak kasar mengandung matriks fitokimia kompleks yang sering kali menunjukkan efek terapeutik pada dosis rendah, namun kehilangan efikasi atau bahkan memicu toksisitas dan stres metabolik pada dosis tinggi. Hal ini dapat terjadi akibat

saturasi reseptor, interaksi antagonis antar-molekul, atau pergeseran sifat antioksidan menjadi pro-oksidan [33]. Fenomena ini secara spesifik relevan untuk *M. oleifera* karena ekstraknya kaya akan senyawa fenolik dan flavonoid (kuersetin, kaempferol) yang secara luas dilaporkan bersifat redoks-aktif: pada konsentrasi rendah berperan sebagai antioksidan dan inhibitor enzim lipogenik, namun pada konsentrasi lebih tinggi berpotensi mengalami auto-oksidasi dan bersifat sitotoksik/pro-oksidan [15, 33]. Dasar pemikiran inilah yang mendasari prediksi bahwa ekstrak *M. oleifera* berpotensi menunjukkan respons bifasik yang bergantung dosis. Selain itu, evaluasi efikasi antiobesitas secara farmakologis tidak cukup hanya mengandalkan kadar lipid absolut, melainkan harus mencakup perhitungan Indeks Aterogenik (Rasio LDL/HDL) untuk memprediksi risiko pembentukan plak aterosklerotik secara komprehensif.

Berdasarkan urgensi tersebut, riset ini dilakukan untuk mengevaluasi secara komprehensif respons bergantung-dosis (*dose-dependent*) dan modulasi indeks aterogenik dari ekstrak etanol daun *M. oleifera* pada model zebrafish DIO. Kami menghipotesiskan bahwa ekstrak etanol daun *M. oleifera* memiliki *therapeutic window* (jendela terapi) tertentu, di mana dosis optimal akan memperbaiki profil lipid dan menurunkan risiko aterogenik secara signifikan, sementara peningkatan dosis berpotensi memicu respons paradoksikal akibat batas saturasi farmakodinamik atau beban metabolik -- sebuah pola yang secara teoritis konsisten dengan perilaku dualistik senyawa polifenol pada dosis tinggi sebagaimana diuraikan di atas.

Metode Penelitian

Persetujuan Etik

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan etik dari Komite Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Universitas Brawijaya dengan nomor *Ethical Clearance* 360/EC/KEPK/09/2016. Seluruh prosedur perlakuan terhadap hewan uji dilaksanakan sesuai dengan pedoman etika penelitian yang berlaku dan prinsip 3R (*Replacement, Reduction, Refinement*).

Material dan Ekstraksi

Material utama yang digunakan adalah daun kelor (*Moringa oleifera*) dan kista *Artemia nauplii*. Ekstrak daun kelor yang digunakan berbentuk ekstrak kasar dengan ukuran partikel 500 mesh yang berasal dari daun kelor yang diperoleh dari Perkebunan Kelor, Kelorina, Blora, Jawa Tengah. Proses ekstraksi dilakukan dengan teknik maserasi menggunakan pelarut etanol 90% di Laboratorium Farmasi Universitas Brawijaya. Ekstrak yang diperoleh kemudian diuapkan pelarutnya hingga diperoleh ekstrak kental yang siap digunakan. Pada penelitian ini, karakterisasi ekstrak dilakukan secara organoleptik dan gravimetrik (rendemen); standardisasi kuantitatif berupa penetapan kadar air, kadar abu, maupun profil fitokimia (misalnya kadar kuersetin atau total flavonoid dengan HPLC) belum dilakukan dan diakui sebagai keterbatasan metodologis (lihat bagian Implikasi Klinis dan Keterbatasan). Zebrafish yang digunakan merupakan zebrafish galur *wild-type* betina berusia 5 months post fertilization (mpf) yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Produksi Pakan Artemia

Artemia diproduksi dengan menetasakan kista *Artemia* dalam air bersuhu 28°C, pH 8, dan tingkat salinitas 15–35 ppt (setara dengan air laut) selama 24 jam. Dalam 2 liter air, ditetaskan sebanyak 4 gram kista. *Artemia* yang telah menetas dipanen dengan metode sifon, yaitu dihisap dan disaring menggunakan saringan plankton dengan lebar pori 25 µm [26].

Pemeliharaan Hewan Uji dan Desain Penelitian

Zebrafish dipelihara dalam sistem akuarium terkontrol. Pada tahap aklimatisasi, 60 ekor zebrafish ditempatkan dalam akuarium berkapasitas 60 L yang diisi 45 L air. Selama masa perlakuan, setiap akuarium percobaan berisi 5 ekor zebrafish betina dalam akuarium berkapasitas 6,4 L dengan volume air 3,5 L, sehingga densitas populasi adalah 1,25 ekor per liter air (mendekati rasio ideal 5 ekor per 4 liter). Suhu air dipertahankan pada 28,5°C yang merupakan suhu optimum bagi zebrafish. Siklus pencahayaan diatur dengan periode 14 jam terang dan 10 jam gelap [27].

Analisis pada naskah ini menggunakan pendekatan complete-case: seekor zebrafish disertakan pada seluruh empat parameter (Kolesterol Total, HDL, LDL/VLDL, AI) hanya apabila ketiga nilai pengukuran mentahnya valid secara simultan, menghasilkan n=9 atau n=10 ekor per kelompok (nilai tunggal dan konsisten

untuk keempat parameter dalam kelompok yang sama, lebih besar dari rancangan awal; lihat catatan kaki Tabel 1), agar estimasi memanfaatkan seluruh informasi yang sesungguhnya tersedia. Induksi obesitas pada penelitian ini menggunakan pendekatan *overfeeding Artemia nauplii*, mengikuti protokol yang telah divalidasi oleh Oka et al. [23] dan Hasumura et al. [25] pada zebrafish, sehingga secara konsisten diistilahkan sebagai model *Diet-Induced Obesity (DIO)/overfeeding-induced obesity*. Keberhasilan induksi model pada penelitian ini dikonfirmasi melalui perubahan profil lipid (peningkatan Kolesterol Total dan Indeks Aterogenik dibandingkan kelompok Non-DIO; lihat bagian Hasil), sebagaimana lazim digunakan sebagai penanda keberhasilan pada studi acuan tersebut. Jumlah sampel akhir per kelompok yang dianalisis pada penelitian ini adalah n=9 atau n=10 ekor (nilai tunggal, konsisten untuk keempat parameter; lihat Tabel 1).

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental dengan lima kelompok perlakuan (n=9-10 per kelompok pada analisis akhir; lihat Tabel 1), yaitu:

1. Kontrol Negatif (Non-DIO): Pakan standar *Artemia* 5 mg/ekor/hari.
2. Kontrol Positif (DIO): Induksi obesitas dengan *Artemia* 60 mg/ekor/hari.
3. Dosis A: DIO (*Artemia* 60 mg/ekor/hari) + ekstrak *M. oleifera* 0,56 ppm.
4. Dosis B: DIO (*Artemia* 60 mg/ekor/hari) + ekstrak *M. oleifera* 1,12 ppm.
5. Dosis C: DIO (*Artemia* 60 mg/ekor/hari) + ekstrak *M. oleifera* 2,24 ppm.

Konsentrasi 0,56 ppm dan 1,12 ppm diadaptasi dari penelitian sebelumnya yang mengevaluasi aktivitas antiobesitas senyawa berbasis tanaman pada model zebrafish DIO [22, 25]. Konsentrasi 2,24 ppm ditambahkan sebagai peningkatan dua kali lipat dari dosis tertinggi untuk mengevaluasi kemungkinan adanya respons bifasik atau efek yang bergantung pada dosis (*dose-dependent effect*). Pemilihan dosis ini tidak didahului oleh studi *range-finding* formal; dosis 2,24 ppm dipilih secara *a priori* sebagai bagian dari desain rentang dosis penuh untuk mengeksplorasi kemungkinan pembalikan atau pemulihan respons pada dosis yang lebih tinggi, mengingat pola non-linear semacam ini telah dilaporkan pada berbagai fitokimia dan ekstrak tanaman [34]. Kami mengakui bahwa ketiadaan studi *range-finding* merupakan keterbatasan metodologis (lihat bagian Implikasi Klinis dan Keterbatasan).

Induksi Obesitas dan Pemberian Perlakuan

Zebrafish diberi makan *Artemia nauplii* sebanyak tiga kali sehari pada pukul 05.00, 10.00, dan 15.00 dengan durasi pemberian 120 menit per sesi. Kelompok DIO menerima total dosis 60 mg/ekor/hari, sedangkan kelompok kontrol negatif menerima 5 mg/ekor/hari [23]. Ekstrak daun kelor dipaparkan ke dalam air akuarium tiga kali sehari, masing-masing selama 105 menit, dimulai 15 menit setelah pemberian makan [25]. Perlakuan diberikan selama 40 hari berturut-turut.

Pengambilan Sampel dan Pengukuran Profil Lipid

Setelah 40 hari perlakuan (hari ke-41), zebrafish dikorbankan dan jaringan lemak visceral diambil melalui proses pembedahan dorsal. Lemak visceral dieksisi dari area profundus gelembung renang [28]. Kadar kolesterol total, HDL, dan LDL/VLDL diukur menggunakan *EnzyChrom™ Cholesterol Assay Kit* sesuai dengan prosedur standar pabrikan. Nilai absorbansi dibaca menggunakan spektrofotometer dan dikonversi menjadi konsentrasi (mg/dL) berdasarkan kurva standar.

Perhitungan Indeks Aterogenik

Untuk mengevaluasi risiko kardiovaskular secara farmakologis, Indeks Aterogenik (AI) dihitung menggunakan rasio LDL/HDL dengan rumus: $AI = LDL/HDL$. Parameter ini digunakan sebagai indikator keseimbangan antara kolesterol aterogenik dan protektif dalam sirkulasi. AI dihitung secara individual untuk setiap ekor zebrafish (bukan dari rasio nilai rata-rata kelompok), kemudian dirangkum pada tingkat kelompok sebagai median dan rentang (minimum-maksimum), konsisten dengan sifat non-parametrik data lipoprotein yang mendasarinya.

Analisis Statistik

Seluruh data (Kolesterol Total, HDL, LDL/VLDL, dan Indeks Aterogenik/AI) tidak memenuhi asumsi distribusi normal (uji *Shapiro-Wilk* terhadap residual, $p < 0,05$ untuk keempat parameter), sehingga seluruhnya disajikan sebagai median (minimum-maksimum) dan dianalisis menggunakan uji *Kruskal-Wallis* yang dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* sebagai *post hoc*; nilai p hasil uji *Mann-Whitney* dikoreksi untuk perbandingan berganda menggunakan koreksi Bonferroni ($k=4$ perbandingan per parameter) guna mengontrol inflasi galat Tipe I. Uji homogenitas dilakukan dengan *Levene's test*. Analisis statistik dilakukan

menggunakan perangkat lunak SPSS versi 20.0 untuk Windows dan Python (SciPy). Nilai dianggap signifikan secara statistik apabila $p < 0,05$ setelah koreksi Bonferroni.

Hasil dan Pembahasan

Profil Lipid dan Indeks Aterogenik

Evaluasi farmakologis terhadap ekstrak etanol daun *M. oleifera* pada model zebrafish *Diet-Induced Obesity* (DIO) menunjukkan adanya modulasi profil lipid yang bergantung pada dosis (*dose-dependent*). Setelah 40 hari perlakuan, induksi DIO menggunakan *Artemia nauplii* secara signifikan meningkatkan kadar Kolesterol Total dan LDL/VLDL, serta menurunkan kadar HDL dibandingkan dengan kelompok Non-DIO ($p < 0,05$). Hal ini dikonfirmasi dengan lonjakan Indeks Aterogenik (AI) dari 2,32 pada kelompok sehat menjadi 7,60 pada kelompok DIO, yang merefleksikan peningkatan risiko kardiovaskular secara signifikan (Tabel 1).

Tabel 1. Profil Lipid dan Indeks Aterogenik Zebrafish Pasca-Perlakuan (40 Hari)

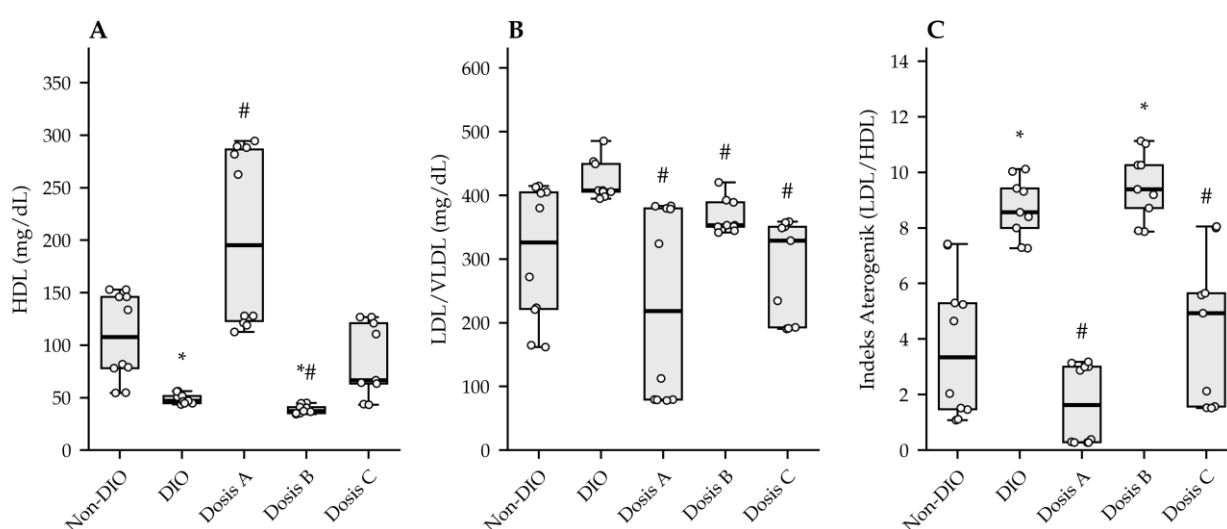
Parameter	Non-DIO (Kontrol Sehat)	DIO (Kontrol Obesitas)	Dosis A (0,56 ppm)	Dosis B (1,12 ppm)	Dosis C (2,24 ppm)
Kolesterol Total (mg/dL), Median (Min-Maks)	138,39 (38,10–239,39)	327,33 (242,08–432,10)*	242,39 (141,09–327,96)	302,59 (223,65–399,60)*	152,99 (89,39–221,16)#
HDL (mg/dL), Median (Min-Maks)	107,70 (54,33–152,84)	47,03 (43,54–56,09)*	195,09 (112,71–294,38)#	37,17 (34,22–44,85)*#	66,69 (43,36–126,85)
LDL/VLDL (mg/dL), Median (Min-Maks)	325,93 (161,65–414,55)	407,75 (394,90–485,21)	218,17 (77,74–383,60)#	352,84 (341,67–420,20)#	328,85 (190,18–358,75)#
Indeks Aterogenik (AI = LDL/HDL per individu), Median (Min-Maks)	3,34 (1,08–7,42)	8,56 (7,27–10,12)*	1,63 (0,27–3,18)#	9,38 (7,87–11,12)*	4,93 (1,51–8,05)#
n per kelompok (complete-case)	10	9	10	9	9

Keterangan: Keempat parameter (Kolesterol Total, HDL, LDL/VLDL, dan Indeks Aterogenik/AI = LDL/HDL dihitung per individu) tidak terdistribusi normal (Shapiro-Wilk terhadap residual, $p < 0,05$) sehingga seluruhnya disajikan sebagai Median (Minimum-Maksimum) dan dianalisis dengan Kruskal-Wallis dilanjutkan Mann-Whitney; nilai p dikoreksi Bonferroni ($k=4$ perbandingan per parameter). * $p < 0,05$ vs kelompok Non-DIO; # $p < 0,05$ vs kelompok DIO (keduanya setelah koreksi Bonferroni). n merupakan jumlah ekor dengan data lengkap pada keempat parameter sekaligus (complete-case). Non-DIO dan Dosis A: seluruh 10 ekor yang tercatat dalam dataset memiliki keempat nilai pengukuran lengkap ($n=10$). DIO: dari 10 ekor yang diukur, 1 ekor dikeluarkan karena nilai HDL tidak terbaca dan nilai LDL/VLDL pada ekor yang sama negatif secara analitik (di luar rentang fisiologis, dianggap artefak pengukuran), sehingga $n=9$. Dosis B: dari 10 ekor yang diukur, 1 ekor dikeluarkan karena nilai HDL tidak terbaca, sehingga $n=9$. Dosis C: dataset penelitian hanya memuat catatan pengukuran lengkap untuk 9 ekor ($n=9$).

Profil Lipid Berdasarkan Dosis

Pemberian ekstrak *M. oleifera* menunjukkan respons bifasik yang menarik. Dosis A (0,56 ppm) menunjukkan efek hipolipidemik paling konsisten di antara ketiga dosis yang diuji: Indeks Aterogenik menurun signifikan dibandingkan DIO (median 1,63 [0,27–3,18] vs 8,56 [7,27–10,12]; $p < 0,05$ terkoreksi Bonferroni), demikian pula HDL meningkat signifikan (median 195,09 [112,71–294,38] mg/dL; $p < 0,05$ vs DIO). Sementara itu, Kolesterol Total pada Dosis A (median 242,39 [141,09–327,96] mg/dL) berada di antara nilai Non-DIO dan DIO tanpa berbeda signifikan dari keduanya setelah koreksi Bonferroni ($p=0,18$ vs Non-DIO; $p=0,10$ vs DIO), sehingga penurunannya sebaiknya diinterpretasikan sebagai tren parsial, bukan pemulihan penuh yang terkonfirmasi secara statistik. Nilai AI yang rendah ini menunjukkan rasio lipoprotein yang pada manusia dikenal berasosiasi dengan risiko kardiovaskular rendah, sehingga berpotensi memiliki relevansi translasional. Namun demikian, nilai ini tidak dapat langsung diartikan sebagai bukti efek protektif vaskular pada zebrafish, mengingat spesies ini tidak mengembangkan aterosklerosis spontan dan belum ada konfirmasi histologis maupun fungsional pembuluh darah pada penelitian ini. Sebaran data setiap individu untuk HDL, LDL/VLDL, dan Indeks Aterogenik disajikan pada Gambar 1. Penyajian ini memperjelas bahwa rentang data yang lebar pada kelompok Dosis A tidak berasal dari sebaran yang menyebar merata, melainkan dari distribusi bimodal: sekitar lima ekor menunjukkan HDL tinggi disertai LDL/VLDL rendah (AI 0,27–0,38), sedangkan ekor lainnya menunjukkan pola sebaliknya (AI 2,87–3,18), tanpa nilai antara. Pola bimodal serupa juga teramati pada kelompok Non-DIO dan Dosis C, namun tidak pada kelompok DIO dan Dosis B. Kami tidak dapat memastikan secara retrospektif penyebab pasti pola ini-kemungkinan mencakup sub-populasi responden dan non-responden yang sesungguhnya, variasi kondisi pemeliharaan, atau faktor teknis pengukuran yang tidak tercatat secara rinci dalam dataset-sehingga hal ini dicantumkan sebagai keterbatasan eksplisit (lihat bagian Implikasi Klinis dan Keterbatasan). Konsekuensinya, estimasi titik AI pada Dosis A perlu diinterpretasikan dengan hati-hati, meskipun perbedaannya terhadap kelompok DIO tetap signifikan setelah koreksi Bonferroni.

Sebaliknya, peningkatan dosis menjadi Dosis B (1,12 ppm) memicu respons yang tidak konsisten antar-parameter lipid. Kolesterol Total pada Dosis B (median 302,59 [223,65-399,60] mg/dL) tetap tidak berbeda signifikan dari DIO ($p=0,87$) dan justru signifikan lebih tinggi dibandingkan Non-DIO ($p=0,005$), mengindikasikan kegagalan perbaikan dislipidemia secara global. Menariknya, LDL/VLDL pada Dosis B justru menurun signifikan dibandingkan DIO (median 352,84 [341,67-420,20] vs 407,75 [394,90-485,21] mg/dL; $p<0,05$), namun HDL pada dosis ini turun ke titik terendah di antara seluruh kelompok (median 37,17 [34,22-44,85] mg/dL), signifikan lebih rendah dibandingkan baik Non-DIO maupun DIO ($p<0,05$ untuk keduanya). Akibatnya, Indeks Aterogenik pada Dosis B tetap tinggi dan tidak berbeda signifikan dari DIO (median 9,38 [7,87-11,12] vs 8,56 [7,27-10,12]; $p=0,74$), mencerminkan bahwa perbaikan parsial pada LDL/VLDL tidak cukup mengimbangi penurunan HDL yang tajam. Pada Dosis C (2,24 ppm), Kolesterol Total menurun signifikan dibandingkan DIO (median 152,99 [89,39-221,16] mg/dL; $p<0,05$) dan Indeks Aterogenik turut membaik secara signifikan (median 4,93 [1,51-8,05] vs 8,56 [7,27-10,12]; $p<0,05$), meskipun tidak seoptimal Dosis A. Karena hanya Dosis A dan Dosis B yang berada dalam rentang dosis yang telah tervalidasi oleh literatur acuan [22, 25], temuan pada Dosis C tetap diperlakukan sebagai observasi sekunder yang memerlukan konfirmasi lebih lanjut, dan tidak dijadikan dasar utama kesimpulan mekanistik penelitian ini.



Gambar 1. Sebaran data individual HDL (A), LDL/VLDL (B), dan Indeks Aterogenik (C) zebrafish pasca-perlakuan 40 hari. Dosis A = 0,56 ppm; Dosis B = 1,12 ppm; Dosis C = 2,24 ppm. Kotak menunjukkan kuartil 1-3 dengan garis tebal sebagai median; whisker menunjukkan nilai minimum dan maksimum; setiap lingkaran mewakili satu ekor ($n=9$ atau $n=10$ per kelompok, complete-case; lihat Tabel 1). * $p<0,05$ vs Non-DIO; # $p<0,05$ vs DIO (Mann-Whitney, terkoreksi Bonferroni, $k=4$). Perlu dicatat bahwa sebaran HDL dan LDL/VLDL pada kelompok Non-DIO, Dosis A, dan Dosis C bersifat bimodal (dua kelompok nilai yang terpisah), bukan sebaran menyebar merata; hal ini merupakan sumber utama rentang data yang lebar pada kelompok-kelompok tersebut.

Pembahasan

Penelitian ini berhasil mendemonstrasikan potensi hipolipidemik ekstrak etanol daun *M. oleifera* pada model zebrafish DIO, sekaligus mengungkap fenomena farmakologis kompleks berupa respons bifasik dan paradoks dosis menengah.

Mekanisme Aksi pada Dosis Optimal (0,56 ppm)

Perlu ditekankan bahwa karena ekstrak yang digunakan adalah ekstrak kasar yang belum distandardisasi secara fitokimia (lihat Implikasi Klinis dan Keterbatasan), atribusi efek pada senyawa spesifik berikut bersifat hipotetis dan didasarkan pada literatur mengenai kandungan senyawa *M. oleifera* secara umum, bukan pada pengukuran langsung terhadap ekstrak yang digunakan pada penelitian ini. Perbaikan profil lipid dan penurunan drastis Indeks Aterogenik (AI) pada Dosis A (0,56 ppm) diduga kuat dimediasi oleh sinergi antara β -sitosterol, kuersetin, dan senyawa fenolik. Secara farmakokinetik, β -sitosterol memiliki struktur sterol yang homolog dengan kolesterol mamalia [29], memungkinkannya berkompetisi dengan kolesterol diet untuk inkorporasi ke dalam misel empedu di usus zebrafish dan berikatan dengan transporter

intestinal *Niemann-Pick C1-Like 1* (NPC1L1)-sebuah target farmakologis yang sama dengan obat ezetimibe [30–32]. Di sisi lain, kuersetin diketahui memfosforilasi jalur AMP-activated protein kinase (AMPK), yang secara alosterik menghambat enzim *Acetyl-CoA carboxylase* (ACC), sehingga menekan *de novo lipogenesis* di hati dan memicu oksidasi asam lemak [7, 17]. Penurunan rasio LDL/HDL (AI) secara signifikan pada dosis ini menunjukkan indikasi bahwa ekstrak kasar pada konsentrasi rendah mampu memodulasi distribusi lipoprotein secara optimal, meskipun mekanisme molekuler pastinya belum dikonfirmasi secara langsung pada penelitian ini.

Fenomena Hormesis dan Paradoks Dosis Menengah (1,12 ppm)

Temuan paling kritis dari penelitian ini adalah hilangnya linearitas dosis-respons. Peningkatan dosis menjadi 1,12 ppm (Dosis B) justru memperburuk profil lipid dan menghasilkan Indeks Aterogenik yang tetap tinggi dan tidak berbeda signifikan dari DIO (median 9,38 [7,87-11,12]). Menariknya, data terbaru menunjukkan bahwa kegagalan ini bersifat spesifik-parameter: LDL/VLDL pada Dosis B justru menurun signifikan dibandingkan DIO, sementara HDL turun ke titik terendah di antara seluruh kelompok dan berbeda signifikan dari Non-DIO maupun DIO. Pola ini secara hipotetis lebih konsisten dengan gangguan spesifik pada metabolisme atau stabilitas partikel HDL pada dosis menengah [35], dibandingkan kegagalan menyeluruh pada seluruh jalur lipid. Dalam farmakologi bahan alam, fenomena ini dapat dijelaskan melalui beberapa mekanisme hipotetis berikut:

1. **Pergeseran Sifat Pro-oksidan (Auto-oksidasi Polifenol):** Kami menduga bahwa polifenol seperti kuersetin, yang bersifat antioksidan pada dosis fisiologis, dapat mengalami auto-oksidasi pada konsentrasi menengah di lingkungan akuatik dan menghasilkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) seperti hidrogen peroksida. Stres oksidatif hepatik yang dihipotesiskan ini berpotensi merusak sel hati, mengganggu sekresi VLDL dan stabilitas partikel HDL, dan memicu akumulasi lipid intraseluler yang berujung pada dislipidemia sekunder [16, 18]. Perlu ditegaskan bahwa penelitian ini tidak mengukur penanda stres oksidatif (misalnya MDA, SOD, katalase) maupun ekspresi gen terkait, sehingga mekanisme ini merupakan hipotesis yang memerlukan pengujian langsung pada penelitian selanjutnya, bukan kesimpulan yang telah terbukti.
2. **Beban Nutrisi dan Saturasi Reseptor:** Daun kelor sangat padat nutrisi (mengandung 2,3% lemak dan 38,2% karbohidrat) [11, 12]. Pada dosis 1,12 ppm, terjadi pemasukan kalori dan asam lemak nabati yang mungkin melebihi kapasitas oksidasi beta mitokondria zebrafish, namun belum cukup tinggi untuk memicu efek pencakar (*bulk laxative*) atau blokade absorpsi fisik di usus. Hal ini secara hipotetis dapat menciptakan beban metabolik yang memperparah steatosis dan dislipidemia; namun demikian, klaim ini belum didukung oleh data pengukuran langsung (misalnya kadar trigliserida hepatik atau histopatologi hati) pada penelitian ini.
3. **Umpan Balik Kompensatorik:** Inhibisi parsial pada reseptor atau enzim (seperti *Pancreatic Lipase*) pada dosis menengah dapat memicu *feedback loop* kompensatorik, seperti *up-regulation* enzim HMG-CoA reduktase endogen, yang justru meningkatkan sintesis kolesterol hepatik. Mekanisme ini juga bersifat spekulatif dan memerlukan konfirmasi melalui pengukuran ekspresi gen atau aktivitas enzim pada penelitian mendatang.

Pemulihan Parsial pada Dosis Tinggi (2,24 ppm)

Menariknya, pada Dosis C (2,24 ppm), terjadi pemulihan parsial di mana Kolesterol Total turun secara signifikan dan AI membaik secara signifikan menjadi median 4,93 [1,51-8,05] dibandingkan DIO. Kami memandang temuan ini sebagai observasi sekunder yang belum terduga (*unexpected secondary finding*), bukan sebagai bagian dari mekanisme utama respons bifasik Dosis A-Dosis B yang menjadi fokus penelitian ini, karena hanya kedua dosis tersebut yang berasal dari rentang dosis yang telah tervalidasi oleh literatur acuan [22, 25]. Dosis C tetap diuji sebagai bagian dari desain rentang dosis penuh (*a priori*) untuk mengeksplorasi kemungkinan pembalikan respons pada dosis yang lebih tinggi. Salah satu kemungkinan penjelasan yang bersifat spekulatif dan belum diuji secara langsung pada penelitian ini adalah bahwa pada konsentrasi masif ini, matriks fitosterol dan serat kasar dari ekstrak etanol dapat bertindak sebagai agen pengikat fisik (*physical binding agent*) yang menjebak asam empedu dan kolesterol diet di lumen usus, mencegahnya diabsorpsi dan memaksa ekskresi melalui feses. Namun, karena mekanisme ini berbeda secara kualitatif dari mekanisme inhibisi enzim/reseptor yang diajukan untuk Dosis A, dan tidak didukung oleh bukti langsung, kami tidak menjadikannya sebagai kesimpulan mekanistik, melainkan sebagai hipotesis yang memerlukan studi lebih lanjut. Temuan ini memberikan peringatan farmasetika yang penting: ekstrak kasar

memiliki *therapeutic window* yang sempit dan tidak selalu mengikuti kurva linear, sehingga standardisasi menuju fraksi terisolasi sangat diperlukan untuk menghindari kesimpulan yang keliru.

Implikasi Klinis dan Keterbatasan

Penggunaan Indeks Aterogenik (AI) dalam penelitian ini memberikan nilai translasional karena AI merefleksikan rasio lipoprotein yang pada manusia dikenal sebagai faktor risiko plak aterosklerotik; namun, karena zebrafish tidak mengembangkan aterosklerosis secara spontan dan fisiologi kardiovaskularnya berbeda signifikan dari manusia, AI pada penelitian ini harus diinterpretasikan sebagai proksi/prediktor berbasis kerangka risiko manusia, bukan bukti langsung perlindungan vaskular atau anti-aterosklerosis pada zebrafish. Meskipun demikian, penelitian ini memiliki sejumlah keterbatasan yang perlu diakui secara eksplisit. Pertama, kandungan senyawa fitokimia aktif dalam ekstrak etanol belum dikuantifikasi secara absolut menggunakan kromatografi (misalnya HPLC/LC-MS/GC-MS), dan ekstrak belum distandardisasi (kadar air, kadar abu), sehingga atribusi efek pada senyawa spesifik seperti β -sitosterol dan kuersetin bersifat hipotetis dan reproduktifitas hasil pada penelitian lain menjadi terbatas. Kedua, mekanisme molekuler (ekspresi gen NPC1L1, AMPK, HMG-CoA reduktase) belum divalidasi melalui analisis transkriptomik, dan tidak ada penanda stres oksidatif (misalnya MDA, SOD, katalase) yang diukur untuk mendukung hipotesis pergeseran pro-oksidan pada Dosis B. Ketiga, penelitian ini tidak menyertakan data toksisitas komplementer seperti pengamatan perilaku, angka kematian, maupun histopatologi organ (terutama hati); oleh karena itu, istilah “toksisitas” dan “stres metabolik” pada naskah ini merujuk pada hipotesis mekanistik berbasis perubahan profil lipid, bukan kesimpulan toksikologis yang telah dikonfirmasi, dan pengukuran ini sangat direkomendasikan untuk penelitian selanjutnya. Keempat, parameter biometrik (berat badan akhir, panjang standar, dan indeks BMI/*Condition Factor*) tidak tersedia dalam naskah ini; dengan demikian, keberhasilan induksi model *overfeeding*/DIO pada naskah ini dikonfirmasi hanya melalui perubahan profil lipid, bukan melalui bukti biometrik langsung. Kelima, pemilihan dosis (0,56; 1,12; dan 2,24 ppm) tidak didahului studi *range-finding* formal, sehingga interpretasi pola bifasik-khususnya temuan pada Dosis C-bersifat eksploratif dan memerlukan konfirmasi pada rentang dosis yang lebih rapat. Keenam, jumlah sampel yang dianalisis pada naskah ini ($n=9$ atau $n=10$ per kelompok, dihitung dengan pendekatan complete-case sehingga konsisten untuk keempat parameter dalam kelompok yang sama) lebih besar dari rancangan awal penelitian (5 ekor per kelompok); kami memilih menggunakan seluruh data individual valid yang sesungguhnya tercatat, bukan hanya subset sesuai rancangan awal, agar estimasi memanfaatkan informasi yang paling lengkap. Kami tidak dapat memastikan secara retrospektif penyebab selisih antara jumlah ekor pada rancangan awal dan jumlah pengukuran individual yang tercatat dalam dataset penelitian, karena catatan penelitian yang tersedia tidak mendokumentasikan alasan tersebut secara eksplisit. Variabilitas data yang besar tetap teramati pada HDL dan LDL/VLDL, khususnya pada kelompok Dosis A, dan hal ini membatasi kekuatan interpretasi. Penyajian data individual pada Gambar 1 menunjukkan bahwa variabilitas tersebut berbentuk distribusi bimodal-dua kelompok nilai yang terpisah tanpa nilai antara-dan bukan sebaran acak; pola serupa juga muncul pada kelompok Non-DIO dan Dosis C. Kami tidak dapat memastikan secara retrospektif penyebab pola bimodal ini karena catatan unit pemeliharaan dan kondisi pengukuran per individu tidak tersedia secara rinci dalam dataset yang ada. Penelitian selanjutnya sebaiknya mencatat dan melaporkan secara eksplisit unit pemeliharaan, ukuran sampel aktual dibandingkan rancangan, serta sumber potensial variabilitas teknis, agar sumber variabilitas semacam ini dapat diidentifikasi secara tepat. Ketujuh, penggunaan zebrafish betina semata membatasi generalisasi terhadap dimorfisme seksual dalam metabolisme lipid. Penelitian selanjutnya harus berfokus pada isolasi dan standardisasi senyawa aktif utama, penambahan parameter toksikologis, studi *range-finding* formal, serta uji *in vivo* pada model mamalia untuk mengonfirmasi jendela terapi yang aman.

Kesimpulan

Ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* menunjukkan respons farmakologis bifasik pada model zebrafish *Diet-Induced Obesity/overfeeding*. Dosis rendah (0,56 ppm) menunjukkan efek hipolipidemik paling konsisten melalui penurunan Indeks Aterogenik secara drastis, yang kami duga dimediasi oleh inhibisi kompetitif NPC1L1 dan aktivasi AMPK-suatu hipotesis mekanistik yang memerlukan konfirmasi molekuler langsung. Sebaliknya, dosis menengah (1,12 ppm) memicu respons yang tidak konsisten antar-parameter lipid-LDL/VLDL membaik namun HDL memburuk secara signifikan-sehingga Indeks Aterogenik tetap tinggi;

kami menduga hal ini berkaitan dengan pergeseran sifat pro-oksidan polifenol yang secara spesifik mengganggu HDL dan/atau beban metabolik, meskipun klaim ini belum dikonfirmasi melalui data histopatologi, perilaku, atau penanda stres oksidatif. Dosis tinggi (2,24 ppm) menunjukkan pemulihan Kolesterol Total dan AI yang signifikan dibandingkan DIO, yang kami perlakukan sebagai temuan sekunder eksploratif, bukan bagian dari mekanisme utama, mengingat dosis ini berada di luar rentang yang telah tervalidasi literatur dan penjelasan mekanistiknya (blokada absorpsi fisik) masih bersifat spekulatif. Indeks Aterogenik yang rendah pada Dosis A menunjukkan rasio lipoprotein yang secara translasional relevan dengan penanda risiko kardiovaskular pada manusia, namun belum dapat diartikan sebagai bukti langsung efek protektif vaskular pada zebrafish. Temuan ini menyoroti pentingnya penentuan *therapeutic window* melalui studi *range-finding* formal, standarisasi fitokimia ekstrak, serta pengukuran parameter toksikologis tambahan dalam pengembangan fitofarmaka untuk dislipidemia.

Konflik Kepentingan

Penulis menyatakan tidak terdapat konflik kepentingan dalam penelitian ini. Seluruh proses penelitian dan penulisan dilakukan secara independen tanpa adanya pengaruh pihak lain, serta bebas dari kepentingan pribadi, finansial, maupun profesional yang berpotensi memengaruhi objektivitas hasil penelitian.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Universitas Brawijaya atas dukungan yang diberikan selama pelaksanaan penelitian ini.

Referensi

- [1] WHO (World Health Organization). 2016. Obesity and Overweight. (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>, diakses tanggal 11 November 2016).
- [2] Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI. 2013. *Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2013*. Jakarta.
- [3] Camp H.S., Ren D., Leff T. 2002. Adipogenesis and fat-cell function in obesity and diabetes. *Trends in molecular medicine*. 8 (9): 442-447.
- [4] Rayalam S., Della-Fera M. A., & Baile C. A. 2008. Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle. *The Journal of nutritional biochemistry*. 19 (11): 717-726.
- [5] Dulloo A. G., Duret C., Rohrer D., Girardier L., Mensi N., Fathi M., Vandermander J. 1999. Efficacy of a green tea extract rich in catechin polyphenols and caffeine in increasing 24-h energy expenditure and fat oxidation in humans. *The American journal of clinical nutrition*. 70 (6): 1040-1045.
- [6] Furuyashiki T., Nagayasu H., Aoki Y., Bessho H., Hashimoto T., Kanazawa K., Ashida H. 2004. Tea catechin suppresses adipocyte differentiation accompanied by down-regulation of PPAR γ 2 and C/EBP α in 3T3-L1 cells. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 68 (11): 2353-2359.
- [7] Ahn J., Lee H., Kim S., Park J., dan Ha T. 2008. The anti-obesity effect of quercetin is mediated by the AMPK and MAPK signaling pathways. *Biochemical and biophysical research communications*. 373 (4): 545-549.
- [8] Ahmed H., Metwally F., Rashad H., Zaazaa A., Ezzat S. M., Salama M. M. 2014. Moringa oleifera offers a multi-mechanistic approach for management of obesity in rats. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 29 (19): 98-106.
- [9] Bais S., Singh G., Sharma R. 2014. Antiobesity and Hypolipidemic Activity of *Moringa oleifera* Leaves against High Fat Diet-Induced Obesity in Rats. *Advances in Biology*, 2014.
- [10] Metwally F. M., Rashad H. M., Ahmed H. H., Mahmoud A. A., Raouf E. R. A., Abdalla, A. M. 2017. Molecular mechanisms of the anti-obesity potential effect of *Moringa oleifera* in the experimental model. *Asian Pacific Journal of tropical biomedicine*. 7 (3): 214-221.
- [11] Gopalakrishnan L., Doriya K., Kumar D. S. 2016. Moringa oleifera: A review on nutritive importance and its medicinal application. *Food Science and Human Wellness*. Beijing Academy of Food Sciences. 5 (2): 49-56.
- [12] Paul L. T., Fowler L. A., Barry R. J., Watts S. A. 2013. Evaluation of *Moringa oleifera* as a dietary supplement on growth and reproductive performance in zebrafish. *Journal of nutritional ecology and food research*. 1 (4): 322-328.

- [13] Rajanandh M.G. dan Kavitha J. 2010. Quantitative estimation of β -sitosterol, total phenolic and flavonoid compounds in the leaves of *Moringa oleifera*. *International Journal of PharmTech Research*. 2 (2): 1409-1414.
- [14] Jideani V.A. dan Diedericks C.F. 2014. Nutritional, therapeutic, and prophylactic properties of *Vigna subterranea* and *Moringa oleifera*. *Antioxidant-antidiabetic agents and human health*.
- [15] Al-Asmari A.K., Albalawi S.M., Athar M.T., Khan A.Q., Al-Shahrani H., Islam M. 2015. *Moringa oleifera* as an Anti-Cancer Agent Against Breast and Colorectal Cancer Cell Lines. *PloS one*. 10 (8): e0135814.
- [16] Leone A., Spada A., Battezzati A., Schiraldi A., Aristil J., Bertoli S. 2015. Cultivation, Genetic, Ethnopharmacology, Phytochemistry and Pharmacology of *Moringa oleifera* Leaves: An Overview. *International Journal of Molecular Sciences*. 16:12791-12835.
- [17] Aguirre L., Arias N., Macarulla M. T., Gracia A., Portillo M. P. 2011. Beneficial effects of quercetin on obesity and diabetes. *Open Nutraceuticals J*. 4: 189-198.
- [18] Jung C.H., Cho I., Ahn, J., Jeon,T.I., dan Ha, T.Y. 2013. Quercetin reduces high-fat diet-induced fat accumulation in the liver by regulating lipid metabolism genes. *Phytotherapy Research*. 27 (1): 139-143.
- [19] Sergeant T., Vanderstraeten J., Winand J., Beguin P., Schneider Y. 2012. Phenolic Compunds and Plant Extracts as Potential Natural Anti-Obesity Substances. *Food Chemistry*. 135: 68-73.
- [20] Moon J., Do H. J., Kim O. Y., Shin M. J. 2013. Antiobesity effects of quercetin-rich onion peel extract on the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes and the adipogenesis in high fat-fed rats. *Food and chemical toxicology*. 58: 347-354.
- [21] Fatema M.K., Chen Z.Y., Wei, G. 2015. β -sitosterol reduce cholesterol levels in high cholesterol diet fed zebrafish. *International Journal of Natural and Social Sciences*. 2: 53-65.
- [22] Meguro S., Hasumura T., Hase T. 2015. Body Fat Accumulation in Zebrafish is Induced by a Diet Rich in Fat and Reduced by Supplementation with Green Tea Extract. *PloS one*. 10: e0120142.
- [23] Oka T., Nishimura Y., Zang L., Hirano M., Shimada Y., Wang, Z., Umemoto N., Kuroyanagi J., Nishimura N., Tanaka T. 2010. Diet-Induced Obesity in Zebrafish Shares Common Pathophysiological Pathways with Mammalian Obesity. *BMC Physiology*. 10: 21.
- [24] Tainaka T., Shimada Y., Kuroyanagi J., Zang L., Oka T., Nishimura Y., Nishimura N., Tanaka T. 2011. Transcriptome analysis of anti-fatty liver action by Campari tomato using a zebrafish diet-induced obesity model. *Nutrition & metabolism*. 8 (1): 88.
- [25] Hasumura T., Shimada Y., Kuroyanagi J., Nishimura Y., Meguro S., Takema Y., dan Tanaka T. 2012. Green tea extract suppresses adiposity and affects the expression of lipid metabolism genes in diet-induced obese zebrafish. *Nutrition & Metabolism*. 9: 73.
- [26] Sorgeloos P., Dhert P., Candreva P. 2001. Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture*. 200 (1): 147-159.
- [27] Reed B. dan Jennings M. 2011. Guidance on the housing and care of Zebrafish. *Southwater: Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals*.
- [28] Imrie D. dan Sadler K.C. 2010. White adipose tissue development in zebrafish is regulated by both developmental time and fish size. *Developmental Dynamics*, 2010. 239 (11): 3013-3023.
- [29] Saeidnia S., Manayi A., Gohari A.R., dan Abdollahi M. 2014. The story of beta-sitosterol-a review. *European Journal of Medicinal Plants*. 4 (5): 590.
- [30] Baek J. S., Fang L., Li A. C., Miller Y. I. 2012. Ezetimibe and simvastatin reduce cholesterol levels in zebrafish larvae fed a high-cholesterol diet. *Cholesterol*.
- [31] Turley S. D. (2008). Role of Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) in intestinal sterol absorption. *Journal of clinical lipidology*. 2 (2): S20-S28.
- [32] Fang L., Liu C., Miller Y. I. 2014. Zebrafish models of dyslipidemia: relevance to atherosclerosis and angiogenesis. *Translational Research*. 163 (2): 99-108.
- [33] Babich H., Schuck A.G., Weisburg J.H., Zuckerbraun H.L. 2011. Research Strategies in the Study of the Pro-oxidant Nature of Polyphenol Nutraceuticals. *Journal of Toxicology*. 2011: 467305. doi:10.1155/2011/467305.
- [34] Jodynis-Liebert J. dan Kujawska M. 2020. Biphasic Dose-Response Induced by Phytochemicals: Experimental Evidence. *Journal of Clinical Medicine*. 9 (3): 718. doi:10.3390/jcm9030718.
- [35] Rosenson R.S., Brewer H.B. Jr., Ansell B.J., Barter P., Chapman M.J., Heinecke J.W., Kontush A., Tall A.R., Webb N.R. 2016. Dysfunctional HDL and atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature Reviews Cardiology*. 13 (1): 48-60.