

PENGARUH SUSPENSI KULIT TELUR AYAM TERHADAP KERUSAKAN HATI PADA TIKUS WISTAR (*Rattus norvegicus*)

*EFFECT OF CHICKEN EGGSHELL SUSPENSION ON LIVER DAMAGE IN WISTAR RATS (*Rattus norvegicus*)*

Nurjannah Damis¹, Aryadi Arsyad², Muhammad Husni Cangara³

¹Program Studi Ilmu Biomedik Sekolah Pascasarjana, Universitas Hasanuddin, Makassar, Indonesia

²Departemen Fisiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, Makassar, Indonesia

³Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, Makassar, Indonesia

email : aryadi.arsyad@med.unhas.ac.id

Abstrak

Hati adalah organ metabolisme di mana racun diserap dari saluran usus dan diangkut ke hati, menyebabkan berbagai jenis kerusakan pada hati. Kulit telur mengandung kalsium karbonat, yang mengurangi parameter oksidatif dan kerusakan jaringan hati. Kebaruan penelitian ini karena peneliti menganalisis pengaruh pemberian suspensi cangkang telur terhadap kerusakan hati pada tikus wistar. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh suspensi kulit telur terhadap kerusakan hati yang diinduksi parasetamol pada tikus Wistar jantan. Metode penelitian menggunakan 25 tikus Wistar jantan (*Rattus norvegicus*) dengan berat 150-200 g dibagi menjadi 5 kelompok (n = 5). Selama satu bulan, tikus diberi 750 mg/kg BB parasetamol secara oral sekali sehari, menyebabkan kerusakan hati. Setelah 1 bulan, mereka dirawat dengan suspensi kulit telur (6,13, 10,0, dan 26,0 mg/kg BB) secara oral selama 7 hari. Setelah perawatan selesai, darah tikus ditarik melalui mata untuk pengukuran ALT dan AST. Nekropsis dilakukan untuk pemeriksaan histopatologis hati. Hasil penelitian menunjukkan tiga dosis suspensi kulit telur secara signifikan mengurangi kadar ALT dan AST pada tikus yang diinduksi parasetamol. Histopatologi hati pada tikus yang diinduksi parasetamol mengungkapkan hingga 50% nekrosis dan sel-sel inflamasi. Pada P2 dan P3, persentase kerusakan hati menurun masing-masing sebesar 25%. Kesimpulan menunjukkan bahwa suspensi kulit telur memiliki efek hepatoprotektif pada kerusakan hati yang diinduksi parasetamol, ditandai dengan penurunan kadar ALT dan AST dan peningkatan histologi hati dengan dosis 10,0 dan 26,0 mg/kg BB.

Kata Kunci : Kerusakan hati; Cangkang telur; Alanin transaminase; Aspartat transaminase; Histopatologi Hati.

Abstract

*The liver is a metabolic organ in which toxins are absorbed from the intestinal tract and transported to the liver, causing various types of damage to the liver. The eggshell contains calcium carbonate, reducing oxidative parameters and liver tissue damage. The novelty of this study is because researchers analyzed the effect of eggshell suspension administration on liver damage in wistar rats. This study aimed to evaluate the effect of eggshell suspension on paracetamol-induced liver damage in male Wistar rats. The study method used 25 male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) weighing 150-200 g divided into 5 groups (n = 5). For one month, rats were given 750 mg/kg of BB paracetamol orally once a day, causing liver damage. After 1 month, they were treated with eggshell suspensions (6.13, 10.0, and 26.0 mg/kg BB) orally for 7 days. After the treatment was completed, the rat's blood was drawn through the eyes for measurements of ALT and AST. Necropsy is performed for histopathological examination of the liver. The results showed three doses of eggshell suspension significantly reduced ALT and AST levels in paracetamol-induced rats. Hepaticology of the liver in paracetamol-induced mice revealed up to 50% necrosis and inflammatory cells. In P2 and P3, the percentage of liver damage decreased by 25%, respectively. The conclusions showed that the eggshell suspension had a hepatoprotective effect on paracetamol-induced liver damage, characterized by a decrease in ALT and AST levels and an increase in liver histology at doses of 10.0 and 26.0 mg/kg BB.*

Keywords : Liver damage; Eggshell; Alanine transaminases; Aspartate transaminases; Hepatic Histopathology.

Received: December 27th, 2022; 1st Revised January 14th, 2023;

2nd Revised January 25th, 2022; Accepted for

Publication : January 30th, 2023

1. PENDAHULUAN

Menurut pusat Statistik Kesehatan Nasional, penyakit hati dianggap sebagai salah satu penyebab utama kematian seluruh dunia (1). Hati merupakan salah satu organ metabolisme utama dan ekskresi secara terus-menerus dimana penempatannya strategis dalam tubuh. Racun yang diserap dari saluran usus mendapat akses pertama ke hati (2). Selain itu, semua proses dalam hati akan melibatkan sel-sel hepatosit, kupffer, stellate, oksigen reaktif dan spesies nitrogen (3).

Diawali dengan penggunaan paracetamol pada dosis berlebihan. Efek dosis yang berlebihan dan penggunaan jangka panjang menimbulkan kerusakan hati parah (4). Ditemukan secara metabolik dibioaktivasi oleh sitokrom P4502E1 (CYP2E1) yang di ekspresikan didaerah perisentral hati menjadi metabolic toksitnya N-Asetil-pbenzokuinoneimin (NAPQI). NAPQI mengikat secara ireversibel ke gugus sulfhidril dari glutathione tereduksi (GSH) (5) (6). Ketika GSH dibawah kritis, pengikatan NAPQI ke target protein dan stress oksidatif bertanggung jawab atas kematian sel. Peningkatan resistensi terhadap efek hepatotoksit yang disebabkan pretreatment mengarah pada autoprotection. Respon ini disertai dengan akumulasi matriks ekstraseluler dan regenerasi yang terganggu (7) (8).

Upaya yang di lakukan untuk mencegah komplikasi yang berat di perlukan terapi yang tepat. Terlepas dari kemajuan luar biasa dalam pengobatan modern, pengobatan gangguan hati

tidak memadai dan banyak formulasi yang mengandung ekstrak herbal digunakan untuk regenerasi sel-sel hati serta dan untuk perlindungan terhadap kerusakan hati (9). Cangkang dan membrane cangkang telur memiliki sifat fungsional yang sangat baik dan aktivitas biologis yang luas (10). Sehingga pada penelitian ini menggunakan cangkang telur pada kerusakan hati yang diinduksi paracetamol.

Kalsium karbonat bertindak sebagai utusan kedua yang memiliki peran penting dalam permeabilitas membrane sel dan mediasi beberapa proses sel (11). Cangkang telur memiliki lapisan mineralisasi yang terdiri dari kalsium karbonat (CaCO₃), kristal berupa kalsit yang mewakili 96% dari berat cangkang, magnesium 1%, karbonat dan Ca fosfat 1% (12). Cangkang telur mengandung komponen organik seperti protein, proteoglikan dan glikoprotein yang dapat membantu mengetahui karakter komposit cangkang telur yang terbentuk untuk digunakan sebagai aplikasi biologis dan kesehatan (13).

Kerusakan hati masih dikaitkan dengan distorsi fungsi metabolisme dan masih menjadi masalah kesehatan utama (14) (15). Oleh karena itu, penelitian menyelidiki efek suspensi cangkang telur pada kerusakan hati terhadap tikus wistar jantan yang diinduksi paracetamol.

2. METODE

Bahan dan Metode

1. Hewan

Tikus putih jantan (*Rattus Norvegicus*)

strain wistar, dengan berat 150-200 gram, umur 3 bulan (diperoleh dari kandang hewan, Jogjakarta). Hewan dipelihara dan dibawah kondisi laboratorium hewan Universitas Hasanuddin pada suhu 25°C, kelembapan relatif 50% dengan siklus gelap terang digunakan untuk percobaan. Diberi diet pakan standar dengan air ad libitum. Protokol Eksperimental Telah Disetujui Oleh Komite Etika Hewan Institusional dari komisi etik penelitian kesehatan (KEPK) FKUH – RSPTN UH – RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo Makassar dan mendapatkan rekomendasi persetujuan etik.

2. Desain Penelitian

Sebanyak 25 ekor hewan dibagi menjadi 5 kelompok, masing-masing 5 ekor.

Kelompok I sebagai kontrol sehat yang menerima larutan (CMC 0,5%) 2 ml/kgbb/sekali sehari selama 4 minggu.

Kelompok II sebagai kontrol positif yang menerima paracetamol 750 mg/kgbb/ sekali sehari selama 4 minggu.

Kelompok P1, menerima paracetamol 750 mg/kgBB dan suspensi cangkang telur dosis rendah (6,13 mg/kgbb) sekali sehari selama 7 hari.

Kelompok P2, menerima paracetamol 750 mg/kgBB dan suspensi cangkang telur dosis sedang (10,0 mg/kgbb) sekali sehari selama 7 hari.

Kelompok P3, menerima paracetamol 750 mg/kgBB dan suspensi cangkang telur dosis tinggi (26,0 mg/kgbb) sekali sehari selama 7 hari. Semua obat uji dan paracetamol diberikan secara oral dengan cara di suspensikan ke

dalam CMC 0.5%.

3. Persiapan Cangkang Telur

Cangkang telur diperoleh dari warung. Cangkang telur di cuci bersih tanpa membuka membrane cangkang telur. lalu direbus selama 15 menit, ditiriskan dan dikeringkan selama 2 hari. Selanjutnya digiling hingga halus dan diayak menggunakan ayakan 100 mesh sehingga cangkang telur menjadi bubuk, terakhir bubuk cangkang telur di suspensikan ke dalam CMC 0,5%

4. Pembuatan Bahan Induksi

Paracetamol tablet (diperoleh dari apotik, Makassar), dan dihaluskan dengan menggunakan lumpeng. kemudian dilarutkan ke dalam CMC 0,5%.

5. Penilaian Parameter Fungsi Hati dan Histopatologi Hati

Sampel darah dikumpulkan dari vena retro-orbital dalam tabung vaculab dibawah anestesi eter. Setelah itu darah yang diheparinisasi disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 5 menit untuk mendapatkan plasma. Kemudian di uji ALT dan AST sebagai indikator cedera hati menggunakan kit diagnostic standar (iChem-535), Makassar.

Bagian hati yang diwarnai Hematoxilyn dan Eosin (H&E), Makassar. Penilaian Derajat Kerusakan berdasarkan kriteria Manja Roenigh (16). Tidak ada perubahan histopatologi; 1. Jika ada degenerasi parenkimatososa <25% diantara sel-sel normal; 2. Jika terjadi degenerasi hidropik/lemak/nekrosis 25-50% dari seluruh lapang pandang; 3. Jika terjadi nekrosis > 50% dari seluruh lapang pandang/kerusakan lain yang lebih parah.

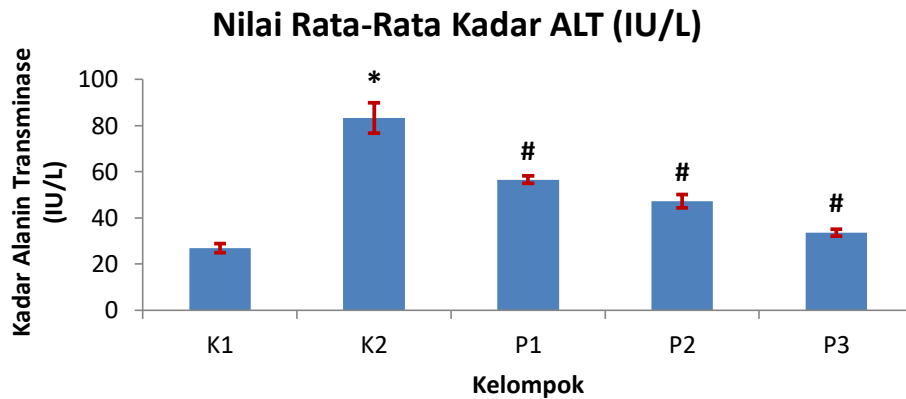
6. Analisis Statistik

Hasil di sajikan sebagai mean ± SD jika sesuai. Perbedaan parameter di tentukan dengan One Way Anova. kelompok individu dibandingkan dengan menggunakan uji posh

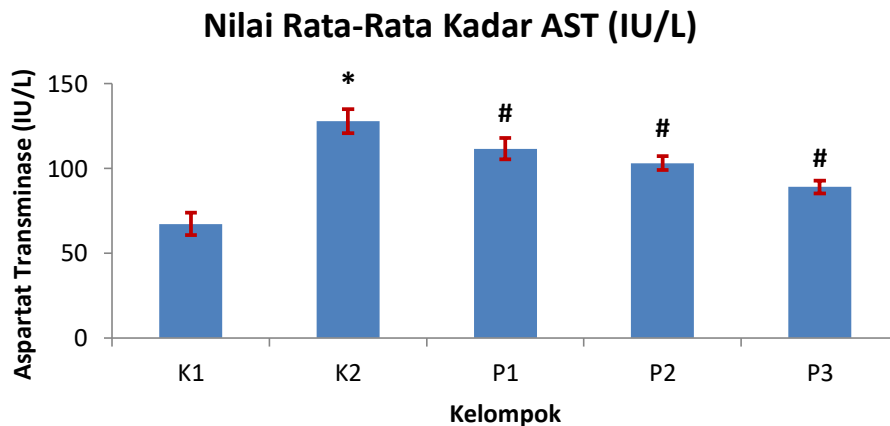
hoc test dan tukey. Signifikan statistik di tunjukkan sebagai berikut: p<0,05. Simbol * diganti dengan # untuk perbandingan.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil



Gambar 1. Grafik yang menunjukkan nilai rata-rata ALT darah tikus pada tiap kelompok perlakuan. Data yang disajikan sebagai mean ± SD (n=5) dan Simbol* dimana nilai p<0.05 signifikan berbeda terhadap kontrol sehat (K1). Simbol # dimana nilai p<0.05 signifikan berbeda terhadap kontrol negatif (K2).



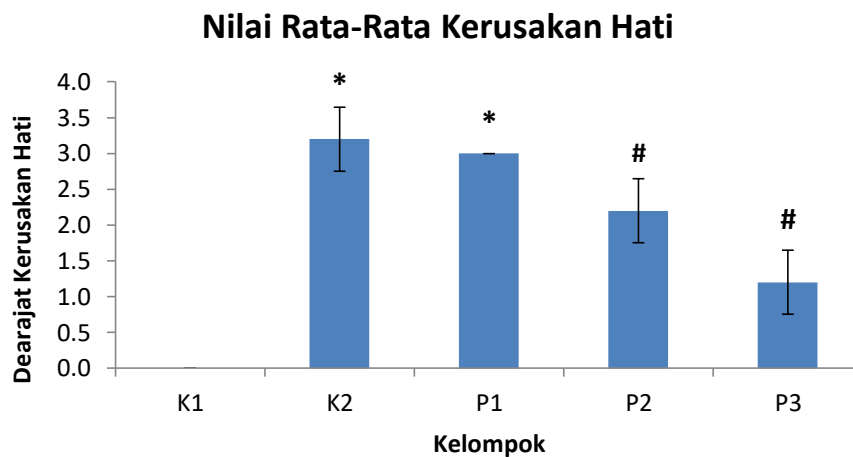
Gambar 2. Grafik yang menunjukkan nilai rata-rata AST darah tikus pada tiap kelompok perlakuan. Data yang disajikan sebagai mean ± SD (n=5) dan Simbol* dimana nilai p<0.05 signifikan berbeda terhadap kontrol sehat (K1). Simbol # dimana nilai p<0.05 signifikan berbeda terhadap kontrol negatif (K2).

Nilai rata-rata kadar ALT (26.92 ± 1.980 IU/L) dan AST (67.220 ± 6.621 IU/L) pada kelompok kontrol sehat (K1) dimana tikus

tanpa diberi paracetamol dan suspensi cangkang telur memiliki kadar ALT terendah. Terjadi peningkatan secara signifikan kadar ALT (83.38

± 6.63 IU/L) dan AST (127.680 ± 7.061 IU/L) pada kontrol negatif (K2) dimana tikus diberi paracetamol 750 mg/kgbb. Berbeda dengan pada kelompok (P1) dimana tikus diberi paracetamol dan suspensi cangkang telur 6,13 mg/kgbb dengan nilai kadar ALT (56.58 ± 1.66 IU/L) dan AST (111.500 ± 6.281 IU/L) mulai menurun secara signifikan, kemudian diikuti kelompok (P2) dimana tikus diberi paracetamol

dan suspensi cangkang telur 10.0 mg/kgbb memiliki nilai kadar ALT (47.30 ± 2.92 IU/L) dan AST (103.060 ± 4.038 IU/L) lebih rendah dari kelompok P1. Dilanjutkan pada kelompok (P3) tikus diberi paracetamol dan suspensi cangkang telur 26.0 mg/kgbb memiliki kadar ALT (33.74 ± 1.50 IU/L) dan AST (89.020 ± 3.755) yang menurun secara signifikan dibandingkan kelompok K2, P1, dan P2.



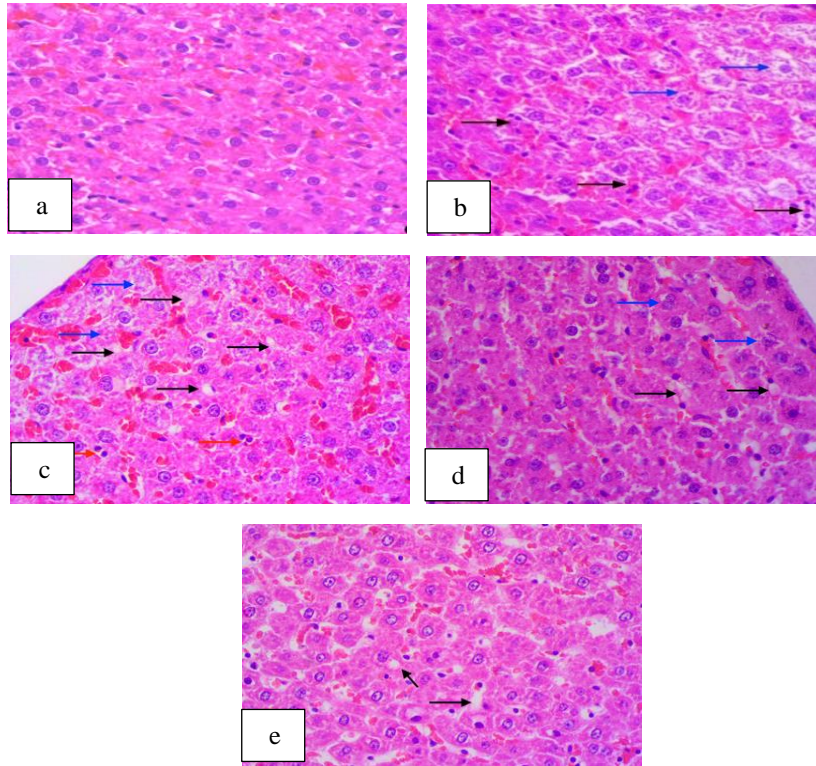
Gambar 3 Grafik rata-rata kerusakan hati tikus pada tiap kelompok. Data yang disajikan sebagai mean \pm SD (n=5) dan memiliki simbol* menunjukkan $p < 0.05$ (signifikan) berbeda terhadap kontrol sehat (K1), simbol # menunjukkan $p < 0,05$ (signifikan) berbeda terhadap kelompok kontrol negatif (K2), dan kelompok P1.

Pada kelompok kontrol sehat dimana tikus tanpa diberi paracetamol dan suspensi cangkang telur memiliki derajat kerusakan 0. Pada kelompok kontrol negatif (K2) dimana tikus diberi paracetamol 750 mg/kgbb dengan kerusakan yang massif dengan derajat kerusakan 3 menunjukkan nilai 3.2 ± 0.45 , pada kelompok ini terlihat degenerasi lemak, nekrosis sel, peradangan sel hepatosit. Pada kelompok P1 dimana tikus diberi suspensi cangkang telur 6.13 mg/kgbb dan paracetamol dengan derajat kerusakan 3 menunjukkan nilai 3 ± 0.00 , terlihat kerusakan sel 50%, terlihat sel

radang hepatosit 50%, nekrotik sel hepatosit, degenerasi sel. Kelompok P2 dimana tikus diberi suspensi cangkang telur 10.0 mg/kgbb derajat kerusakan 2 dan 3 menunjukkan nilai 2.2 ± 0.45 , terlihat nekrotik sel 50% dan 25%, sel radang 25%, dan terlihat jarak antar sel radang dan bengkak. Kelompok P3 dimana tikus diberi suspensi cangkang telur 26.0 mg/kgbb dan paracetamol) dengan derajat kerusakan 1 dan 2 menunjukkan nilai 1.2 ± 0.45 , terlihat degenerasi sel hepatosit 25%, sel hepatosit 25% dan terlihat antar sel/bengkak. Derajat kerusakan hati tikus yang menurun

secara signifikan setelah diberikan perlakuan

yakni kelompok P3 dan P2



Gambar 4. (a) Kelompok K1: kelompok kontrol sehat tanpa paracetamol dan suspensi cangkang telur pada tikus: tidak terlihat adanya peradangan pada sel hepatosit. (b) kelompok K2 (tikus yang diberi paracetamol 750 mg/kgbb): Nekrotik sel hepatosit 50% (biru), degenerasi lemak, terlihat peradangan sel 50% (merah). (c) kelompok P1 (tikus yang diberi paracetamol dan suspensi cangkang telur 6,13 mg/kgbb): peradangan pada sel 50% (merah), nekrotik sel hepatosit 50% (biru) dan degenerasi lemak (hitam). (d) kelompok P2 (tikus yang diberi paracetamol dan suspensi cangkang telur 10.0 mg/kgbb): terlihat nekrotik sel hepatosit 25% (biru) dan terlihat antar jarak sel/bengkak (hitam). (e) kelompok P3 (tikus yang diberi paracetamol dan suspensi cangkang telur 26.0 mg/kgbb): jarak antar sel (hitam). H & E 40X

Pembahasan

Tujuan dari penelitian adalah untuk mengetahui efek suspensi cangkang telur terhadap kerusakan hati pada tikus *putih* (*Rattus Norvegicus*) yang diinduksi paracetamol. Tikus yang digunakan adalah tikus yang umur 3 bulan, kondisi sehat.

Pada penelitian ini, pada kelompok K1 tanpa pemberian perlakuan apapun tidak terlihat peningkatan kadar ALT dan AST serta pemeriksaan histopatologi area sel hepatosit

normal, pemberian paracetamol pada kelompok K2 hewan menghasilkan peningkatan secara signifikan kadar ALT dan AST dan pada pemeriksaan histopatologi menunjukkan area yang mengalami sel radang terlihat, nekrotik sel hepatosit dan degenerasi lemak (Gambar 3.b)

Selain itu, kelompok P1, P2, P3 yang diberikan suspensi cangkang telur selama 7 hari memiliki kadar ALT dan AST yang secara signifikan menurun, serta memberikan pengaruh yang signifikan menurunkan derajat

kerusakan hati yang diinduksi paracetamol berdasarkan pemeriksaan histopatologi (Gambar 3c-e).

Radikal bebas yang disebabkan konsumsi paracetamol berlebihan, menyebabkan ikatan kovalen dari metabolik toksik memproduksi NAPQI (N-acetyl-p-benzoquinoneimine) ke kelompok protein sulfhydryl. Hal ini menyebabkan GSH tereduksi dihati sehingga mengakibatkan radang sel hepatosit, nekrotik sel hepatosit dan degenerasi sel (Goldfrank LR dkk. N.d. 2002 dikutip (Pramitha P, 2007). Peningkatan transaminase merupakan indicator kebocoran seluler dan hilangnya integritas fungsional membrane sel hati (17) (18).

Dalam penelitian ini, efek suspensi cangkang telur yang diinduksi paracetamol tampak adanya aktivitas regenerasi hepatosit yang hampir menyeluruh pada kelompok P2 dosis sedang (10.0mg/kgbb) dan P3 dengan dosis tinggi (26,0 mg/kgbb). Aktivitas regenerasi hepatosit tersebut juga serupa dengan penelitian yang dilakukan (19), bahwa CaCO₃ dari cangkang telur dengan dosis tinggi yang mendapatkan penurunan enzim hati dan menurunkan parameter oxidative pada tikus yang diberi diet cangkang telur.

Kalsium karbonat yang terkandung dalam cangkang telur ini merupakan salah satu mikromineral yang dibutuhkan untuk struktur tulang, gigi, transmisi impuls saraf, kontraksi otot dan eksitabilitas neuromuscular. kalsium karbonat dari cangkang telur juga mudah tersedia (20) (21).

Selanjutnya menghambat enzim sintase asam lemak, dan peningkatan lipofisis (22).

Menurut Johnson & Trebak (2019) bahwa CaCo memiliki peran penting dalam pemeliharaan permeabilitas membran sel dan sebagai utusan kedua yang memediasi beberapa proses sel (11). Selain itu, CaCo dapat mempengaruhi pengaturan metabolisme energi (23).

Hasil penelitian dilakukan Zarghani et al., (2018) menjelaskan bahwa kalsium dapat memberikan efek hepatoprotektif dengan dengan diet kalsium karbonat kombinasi. Penelitian menyimpulkan bahwa kemampuan hepatoprotektif terhadap cedera hati parah disebabkan oleh efek kalsium karbonat yang tinggi dari cangkang telur.

Selain itu, CaCO₃ dapat mengurangi biomarker inflamasi yang memicu tumor (24). Sebagaimana diketahui salah satu proses kerusakan hati terjadi akibat pemberian paracetamol secara berlebihan merupakan produksi radikal bebas yang sangat hepatosit. Cangkang telur menekan produksi radikal bebas dan stress oxidative melalui perannya sebagai kalsium karbonat pada hati (19), sehingga mencegah perkembangan kerusakan hati akibat paracetamol. Pada penelitian suspensi cangkang telur diperlukan penelitian yang lebih lanjut untuk mengetahui mekanisme terhadap kerusakan hati.

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa pemberian suspensi cangkang telur suspensi kulit telur memiliki efek hepatoprotektif pada kerusakan hati yang diinduksi parasetamol, ditandai dengan penurunan kadar ALT dan AST dan peningkatan histologi hati dengan dosis 10,0

dan 26,0 mg/kg BB.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada dosen pembimbing yang telah memberi banyak bimbingan hingga penelitian ini dapat terselesaikan. Ucapan terimakasih juga penulis sampaikan kepada seluruh pihak yang turut serta membantu penulis baik sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian ini

DAFTAR PUSTAKA

1. Pagidipati NJ, Gaziano TA. Estimating deaths from cardiovascular disease: A review of global methodologies of mortality measurement. *Circulation*. 2013;127(6):749–56.
2. S Z, S A, Alizadeh M, Rameshrad M, Garjani A, Soraya H. The effect of metformin combined with calcium-vitamin D3 against diet-induced nonalcoholic fatty liver disease. *Adv Pharm Bull*. 2018;8(1).
3. Loguercio C, Federico A. Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. *Free Radic Biol Med*. 2003;34(1):1–10.
4. Eka C, Harianto W, Hasian T, Widyaningsih TD. Pada Tikus Wistar Jantan Yang Diinduksi Parasetamol The Effectiveness Hepatoprotector of Single Clove Garlic Extract against Paracetamol Induced Hepatotoxicity in Male Wistar Rats. *Pangan dan Agroindustri*. 2018;6(4):1–10.
5. Pierce RH, Franklin CC, Campbell JS, Tonge RP, Chen W, Fausto N, et al. Cell culture model for acetaminophen-induced hepatocyte death in vivo. *Biochem Pharmacol*. 2002;64(3):413–24.
6. Botta D, Shi S, White CC, Dabrowski MJ, Keener CL, Srinouanprachanh SL, et al. Acetaminophen-induced liver injury is attenuated in male glutamate-cysteine ligase transgenic mice. *J Biol Chem*. 2006;281(39):28865–75.
7. Liu ZX, Han D, Gunawan B, Kaplowitz N. Neutrophil depletion protects against murine acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology*. 2006;43(6):1220–30.
8. Jaeschke H, Williams CD, Ramachandran A, Bajt ML. Acetaminophen hepatotoxicity and repair: The role of sterile inflammation and innate immunity. *Liver Int*. 2012;32(1):8–20.
9. Chattopadhyay RR. Possible mechanism of hepatoprotective activity of *Azadirachta indica* leaf extract: Part II. *J Ethnopharmacol*. 2003;89(2–3):217–9.
10. Chen Y, Sheng L, Gouda M, Ma M. Impact of ultrasound treatment on the foaming and physicochemical properties of egg white during cold storage. *Lwt*. 2019;113:108303.
11. Johnson M, Trebak M. ORAI channels in cellular remodeling of

- cardiorespiratory disease. *Cell Calcium*. 2019;79(December 2018):1–10.
12. de Oliveira Freitas DM, Stampini Duarte Martino H, Machado Rocha Ribeiro S, Gonçalves Alfenas RC. Ingesta de calcio y control de la obesidad. *Nutr Hosp*. 2012;27(6):1758–71.
 13. Guru PS, Dash S. Sorption on eggshell waste - A review on ultrastructure, biomineralization and other applications. *Adv Colloid Interface Sci*. 2014;209:49–67.
 14. Chaitanya D, Challa SR, Reddy A. Hepatoprotective effect of biherbal ethanolic extract against paracetamol-induced hepatic damage in albino rats. *J Ayurveda Integr Med*. 2012;3(4):198–203.
 15. Tanessa M, P GAP, Chiuman L, Kotsasi F. Effectiveness Of Andaliman Extract Nanoemulsion (*Zanthoxylum Acanthopodium* De) Against Lipid Profile In Streptozotocin-Induced Wistar Male Rats (Stz). *Gorontalo J Heal Sci Community*. 2023;7(1):27–34.
 16. Cahya N, Dewi R, Hasan M, Helianti D. Ekstrak Ethanol Kulit Bawang Merah (*Allium Cepa* L.) Memperbaiki Kerusakan Hati Tikus Wistar Yang Diinduksi Diazinon. *J Kedokt dan Kesehat Publ Ilm Fak Kedokt Univ Sriwij*. 2022;9(3):263–70.
 17. Mohamad NE, Yeap SK, Lim KL, Yusof HM, Beh BK, Tan SW, et al. Antioxidant effects of pineapple vinegar in reversing of paracetamol-induced liver damage in mice. *Chinese Med (United Kingdom)*. 2015;10(1):1–10.
 18. Zarghani SS, Abbaszadeh S, Alizadeh M, Rameshrad M, Garjani A, Soraya H. The effect of metformin combined with calcium-vitamin D3 against diet-induced nonalcoholic fatty liver disease. *Adv Pharm Bull*. 2018;8(1):97–105.
 19. El-Zeftawy M, Ali SAEM, Salah S, Hafez HS. The functional nutritional and regulatory activities of calcium supplementation from eggshell for obesity disorders management. *J Food Biochem*. 2020;44(8):1–19.
 20. Bartter J, Diffey H, Yeung YHO, O’Leary F, Hasler B, B MW, et al. Use of chicken eggshell to improve dietary calcium intake in rural sub-Saharan Africa. *Matern Child Nutr*. 2018;14 (Februa):1–10.
 21. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Kadar Serum Aspartat Aminotransferase Dan Setelah Pemberian Asetaminofen Per Oral. 2007.
 22. Zhang F, Ye J, Zhu X, Wang L, Gao P, Shu G, et al. Anti-obesity effects of dietary calcium: The evidence and possible mechanisms. *Int J Mol Sci*. 2019;20(12).

23. Nobre JL, Lisboa PC, Santos-Silva AP, Lima NS, Manhães AC, Nogueira-Neto JF, et al. Calcium supplementation reverts central adiposity, leptin, and insulin resistance in adult offspring programmed by neonatal nicotine exposure. *J Endocrinol.* 2011;210(3):349–59.
24. Hopkins MH, Owen J, Ahearn T, Fedirko V, Flanders WD. Effects of Supplemental Vitamin D and Calcium on Biomarkers of Inflammation in Colorectal Adenoma Patients : A Randomized , Controlled Clinical Trial. :1645–54.