

**PENGARUH KOMBINASI MADU DAN HABBATUSSAUDA TERHADAP
PERSENTASE FRAKSI AREA FIBROSIS GINJAL
(Studi Eksperimental pada Tikus Putih Jantan Galur Wistar yang Diinduksi
Obstruksi Ureter Unilateral)**

SKRIPSI

Untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai gelar Sarjana Kedokteran



Oleh :

Yusri Apriliani Karyono

30101800185

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG
2022**

SKRIPSI

PENGARUH KOMBINASI MADU DAN HABBATUSSAUDA TERHADAP PERSENTASE FRAKSI AREA FIBROSIS GINJAL

(Studi Eksperimental pada Tikus Putih Jantan Galur Wistar yang
Diinduksi Obstruksi Ureter Unilateral)

Yang dipersiapkan dan disusun oleh

Yusri Apriliani Karyono

30101800185

telah dipertahankan di depan Dewan Penguji
pada tanggal 20 Januari 2022
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Susunan Tim Penguji :

Pembimbing I

dr. Ulfah Dian Indrayani, M.Sc.

NIK. 210104081

Anggota Tim Penguji I

dr. Sumarno M.Si.Med., Sp.PA

NIK. 210103076

Pembimbing II

Dr.Drs. Israhnanto Isradji, M.Si.

NIK. 210189027

Anggota Tim Penguji II

Dr. Dra. Atina Husaana Apt.M.Si.

NIK. 210198047

Semarang, 8 Februari 2022

Fakultas Kedokteran

Universitas Islam Sultan Agung

Dekan,



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

NIK. 210199049

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Yusri Apriliani Karyono

NIM : 30101800185

Dengan ini menyatakan bahwa Skripsi yang berjudul:

**“PENGARUH KOMBINASI MADU DAN HABBATUSSAUDA
TERHADAP PERSENTASE FRAKSI AREA FIBROSIS GINJAL**

**(Studi Eksperimental pada Tikus Putih Jantan Galur Wistar yang Diinduksi
Obstruksi Ureter Unilateral)”**

adalah benar hasil karya saya dan penuh kesadaran bahwa saya tidak melakukan tindakan plagiasi atau mengambil alih seluruh atau sebagian besar karya tulis orang tanpa menyebutkan sumbernya. Jika saya terbukti melakukan tindakan plagiasi, saya bersedia menerima sanksi sesuai dengan peraturan yang berlaku.

Semarang, 20 Januari 2022
Yang menyatakan,



Yusri Apriliani Karyono

PRAKATA

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Alhamdulillah puji syukur kehadiran Allah SWT karena berkat rahmat, karunia, serta ridha-Nya sehingga penulis diberi kesempatan, kesehatan, kesabaran, serta kekuatan dalam menyelesaikan skripsi dengan judul, **“PENGARUH KOMBINASI MADU DAN HABBATUSSAUDA TERHADAP PERSENTASE FRAKSI AREA FIBROSIS GINJAL Studi Eksperimental pada Tikus Putih Jantan Galur Wistar yang di Induksi Obstruksi Ureter Unilateral”**.

Skripsi ini merupakan bagian dari penelitian dosen yang sebagian didanai oleh dana penelitian FK UNISSULA 2020/2021 dan sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar sarjana kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Dengan ini saya selaku penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S.H., Sp.KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
2. dr. Ulfah Dian Indrayani, M.Sc dan Dr.drs. Israhanto Isradji, M.Si._selaku dosen pembimbing I dan II yang telah meluangkan waktu untuk mengarahkan dan membimbing penulis dalam menyusun skripsi ini.
3. dr. Sumarno, Sp.PA, M.Si. Med. dan Dr. Dra. Atina Husaana Apt. M.Si. selaku dosen penguji yang telah meluangkan waktu untuk mengarahkan dan membimbing penulis dalam menyusun skripsi ini.

4. Pak Yuli Yanto dan Bu Th. Tri Susanti Nugraheni selaku staf Pusat Studi Pangan dan Gizi UGM yang telah membantu dalam kelancaran pelaksanaan penelitian ini.
5. Staf Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Islam Sultan Agung Semarang (Pak Hadi, Bu Sukma, Mas Alvin), dr. Kamilia, staf Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran UNISSULA, MbK Ita, dan segenap satpam IBL yang telah membantu dalam kelancaran penelitian ini.
6. Yangti Sumiati, Ayah Yuyun Karyono, Bunda Sri Susilowati, Kakak Yenyen Sulistio Iriana Karyani, MbK Tria, dan Om Tri yang telah memberikan doa, fasilitas, dan dukungan selama menyusun skripsi ini.
7. MbK Cynthia Andrina Illahi Hermawan dan MbK Fadithya Rizki Nasafly yang telah membantu, memberi semangat, dan dukungan selama penyusunan skripsi ini. Tidak lupa juga, teman seperjuangan selama penelitian, yaitu Hanifah Tiara Putri, Gita Atiqa Faidiansyah, Hilwa Qonita Almazia, dan Mirella Fatika Balqiszura, serta Wildan Chanieful Wajjih. Teman sekaligus sahabat yang telah memberikan dukungan dan motivasi, yaitu Anisa.
8. Keluarga besar Asisten Laboratorium Histologi FK UNISSULA, diantaranya kakak-kakak KROMOFIL 2017, adik-adik Fibrosa 2019, dan khususnya Axon 2018, serta keluarga besar AVENZOAR 2018 yang telah mendukung penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
9. Semua pihak yang telah ikut membantu dalam menyelesaikan skripsi ini yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih belum dari sempurna, maka dari itu saya selaku penulis mengharapkan kritikan dan saran dari pembaca agar penulis dapat memperbaiki diri dan skripsi berikutnya lebih baik lagi. Sebagai akhir kata, penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat dan memberikan wawasan bagi pembaca pada umumnya dan bagi mahasiswa kedokteran pada khususnya.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

Semarang, 20 Januari 2022
Penulis,



Yusri Apriliani Karyono

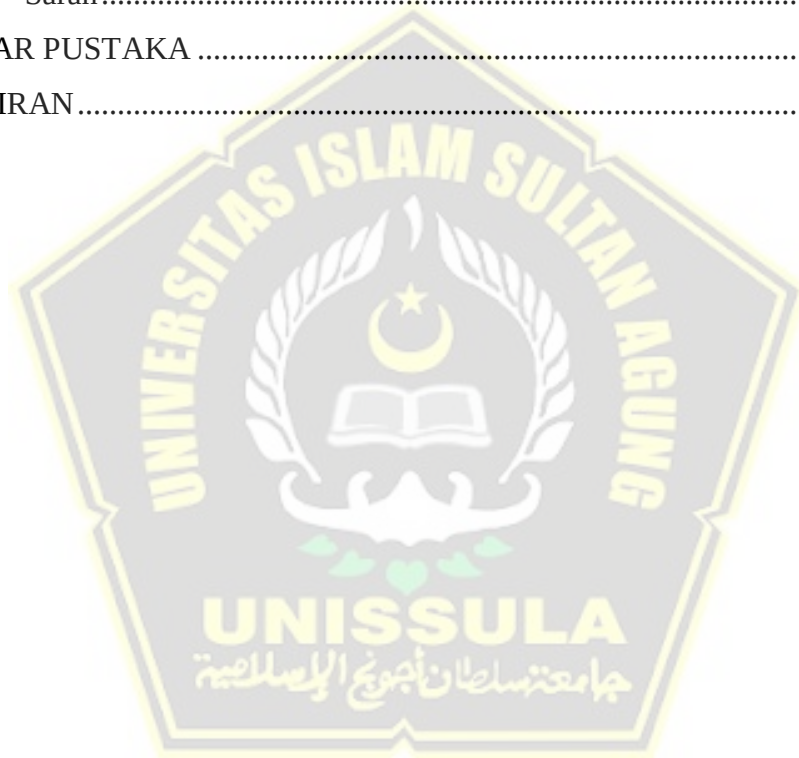


DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
SURAT PERNYATAAN.....	iii
PRAKATA.....	iv
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR SINGKATAN	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
INTISARI.....	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1. Tujuan Umum	4
1.3.2. Tujuan Khusus	4
1.4. Manfaat Penelitian.....	5
1.4.1. Manfaat Teoritis.....	5
1.4.2. Manfaat Praktis	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1. Fibrosis Ginjal	6
2.1.1. Anatomi, Fisiologi, dan Histologi Ginjal.....	6
2.1.2. Definisi dan Patomekanisme Fibrosis Ginjal.....	12
2.1.3. Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Fibrosis Ginjal	18
2.1.4. Efek Obstruksi Ureter Unilateral pada Histopatologi Ginjal	20
2.1.5. Penilaian Fibrosis Ginjal	22
2.2. Habbatussauda.....	23
2.2.1. Klasifikasi	23

2.2.2.	Deskripsi Habbatussauda	23
2.2.3.	Kandungan Habbatussauda	25
2.3.	Madu.....	26
2.3.1.	Deskripsi Madu	26
2.3.2.	Kandungan Madu	27
2.3.3.	Manfaat Madu	28
2.3.4.	Efek Farmakologi Madu	28
2.4.	Hubungan Kombinasi Madu dan Habbatussauda terhadap Persentase Fraksi Area Fibrosis Ginjal	31
2.5.	Kerangka Teori.....	34
2.6.	Kerangka Konsep	35
2.7.	Hipotesis	35
BAB III METODE PENELITIAN.....		36
3.1.	Jenis dan Rancangan Penelitian.....	36
3.2.	Variabel dan Definisi Operasional	36
3.2.1.	Varibel Penelitian.....	36
3.2.2.	Definisi Operasional.....	36
3.3.	Subjek Uji.....	37
3.3.1.	Populasi Penelitian.....	37
3.3.2.	Sampel Penelitian.....	38
3.4.	Alat dan Bahan Penelitian	39
3.4.1.	Alat Penelitian.....	39
3.4.2.	Bahan Penelitian.....	40
3.5.	Cara Penelitian.....	41
3.5.1.	Persiapan Sampel	41
3.5.2.	Cara Menginduksi Fibrosis Ginjal	41
3.5.3.	Persiapan Kombinasi Madu dan Habbatussauda	43
3.5.4.	Pelaksanaan Penelitian	44
3.5.5.	Pengambilan Ginjal.....	46
3.5.6.	Pembuatan dan Pembacaan Preparat Histopatologi	46
3.6.	Alur Penelitian.....	48

3.7. Tempat dan Waktu Penelitian	49
3.7.1. Tempat Penelitian.....	49
3.7.2. Waktu Penelitian	49
3.8. Analisis Hasil.....	49
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	50
4.1. Hasil Penelitian.....	50
4.2. Pembahasan Hasil.....	54
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	59
5.1. Kesimpulan.....	59
5.2. Saran	60
DAFTAR PUSTAKA	61
LAMPIRAN.....	68



DAFTAR SINGKATAN

ACR	: Albumin-to-Creatinine Ratio
ADH	: <i>Antidiuretic Hormone</i>
AER	: <i>Albumin Excretion Rate</i>
ATP	: Adenosin Tripospat
CBG	: <i>Cytosol β-Glukosidase</i>
CD34	: <i>Cluster of Differentiation 34</i>
CES	: Cairan Ekstra Selular
COMTs	: Catechol-O-Methyltransferase
COX-2	: <i>Cyclooxygenase- 2</i>
CTGF	: <i>Connective Tissue Growth Factor</i>
DDR2	: <i>Discoidin Domain Receptor 2</i>
ECM	: <i>Extracellular Matrix</i>
EMT	: <i>Epithelial Mesenchymal Transition</i>
EndoMT	: <i>Endothelial–Mesenchymal Transition</i>
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
FSP1	: <i>Fibroblast-Specific Protein 1</i>
GFR	: <i>Glomerular Filtration Rate</i>
GLUT2	: <i>Glucose Transporter</i>
HGF	: <i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HIF	: <i>Hypoxia-Inducible Factor</i>
IFN- γ	: Interferon Gamma
IFTA	: <i>Renal Interstitial Fibrosis and Tubular Atrophy</i>
IgA	: Immunoglobulin A
IL-1	: Interleukin-1
JG	: Jukstaglomerularis
KDIGO	: Kidney Disease : Improving Global Outcomes
LPH	: <i>Laktase Phlorizin Hydrolase</i>
LPS	: Lipopoly-Saccharide
MDA	: Malondialdehyd

MCP-1	: <i>Monocyte Chemotactic Protein</i>
MET	: <i>Mesenchymal to Epithelial Transition</i>
MMP-9	: <i>Matrix Metalloproteinase 9</i>
MPGN	: <i>Membranous-Proliferative Glomerulonephritis</i>
MRP 1	: <i>Multidrug-Resistance-Associated Proteins</i>
MT1-MMP	: <i>Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinase</i>
NO	: <i>Nitric Oxide</i>
NSO	: <i>Nigella sativa Oil</i>
PAS	: <i>Periodic Acid-Schiff</i>
PDGF	: <i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
(PPAR) γ	: <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i>
RISKESDAS	: <i>Riset Kesehatan Dasar</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SGLT1	: <i>Sodium-Dependent Glucose Transporter 1</i>
SULTs	: <i>Sulfotransferases</i>
TGF- β 1	: <i>Transforming Growth Factor β1</i>
TIF	: <i>Tubulointerstitial Fibrosis</i>
TIMP-2	: <i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2</i>
TIMPs	: <i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinases</i>
TKD	: <i>Tubulus Kontortus Distal</i>
TKP	: <i>Tubulus Kontortus Proksimal</i>
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
TQ	: <i>Thymoquinone</i>
UGTs	: <i>Uridine-5'-Diphosphate Glucuronosyltransferases</i>
UUO	: <i>Unilateral Ureteral Obstruction</i>
ZO-1	: <i>Zona Occludens Protein-1</i>
α -SMA	: <i>Alpha Smooth Muscle Actin</i>

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1.	Hasil Uji Deskriptif Statistik, Normalitas Sebaran Data, Homogenitas Varian, dan Uji Beda Kruskal wallis	53
Tabel 4.2.	Hasil Uji Mann Whitney Perbedaan Persentase Fibrosis Antar Dua Kelompok	53



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Struktur Ginjal.....	6
Gambar 2.2.	Sirkulasi Ginjal.....	7
Gambar 2.3.	Nefron Ginjal	8
Gambar 2.4.	Struktur Korpuskel Ginjal	9
Gambar 2.5.	Sel Tubulus Kontortus Proksimal dan Tubulus Kontortus Distal (Mescher & Junqueira, 2013)	10
Gambar 2.6.	Apparatus Jukstaglomerular.....	11
Gambar 2.7.	Duktus Koligentes dan Ansa Henle	12
Gambar 2.8.	Fibrosis ginjal.....	13
Gambar 2.9.	Perkembangan Penyakit Ginjal Kronis secara Seluler.....	13
Gambar 2.10.	Keterlibatan Sel-Sel dalam Fibrosis Interstisial.....	18
Gambar 2.11.	Gambaran Mikroskopis dan Makroskopis Ginjal dengan Sham Operation dan UUO	22
Gambar 2.12.	Penilaian Fibrosis Interstisial dengan Pewarnaan Sirius red	23
Gambar 2.13.	Tumbuhan Habbatussauda	24
Gambar 2.14.	Biji Habbatussauda.....	25
Gambar 2.15.	Mekanisme Anti-Fibrotik Madu	29
Gambar 2.16.	Kerangka Teori.....	34
Gambar 2.17.	Kerangka Konsep	35
Gambar 3.1.	Alur Penelitian	48
Gambar 4.1.	Gambaran Histopatologi Ginjal Tikus Pewarnaan Sirius red dengan Perbesaran 400x.....	51
Gambar 4.2.	Median Persentase Fraksi Area Fibrosis Ginjal Setiap Kelompok.....	52

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Pembuatan dan Pembacaan Preparat Histopatologi	68
Lampiran 2.	Data Penelitian	70
Lampiran 3.	Data Hasil Uji Deskriptif	71
Lampiran 4.	Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas	73
Lampiran 5.	Hasil Uji Parametrik/ Non-Parametrik.....	74
Lampiran 6.	Hasil Data Uji <i>Post hoc/ Mann Whitney</i>	75
Lampiran 7.	Surat Izin Penelitian	81
Lampiran 8.	Surat Keterangan Pemakaian Laboratorium	82
Lampiran 9.	Surat Keterangan Bebas Laboratorium	83
Lampiran 10.	<i>Ethical Clearance</i>	84
Lampiran 11.	Dokumentasi Penelitian	85
Lampiran 12.	Undangan Seminar Hasil.....	88



INTISARI

Madu mengandung senyawa fenolik dan flavonoid, sedangkan habbatussauda mengandung timokuinon yang berperan sebagai antioksidan, anti-inflamasi, dan anti-fibrotik. Kombinasi keduanya dapat meningkatkan efek antioksidan dan anti-inflamasi sehingga ginjal lebih terproteksi dibandingkan pemberian tunggal. Tujuan penelitian ini, yaitu mengetahui pengaruh kombinasi madu dan habbatussauda terhadap persentase fraksi area fibrosis ginjal pada tikus yang diinduksi obstruksi ureter unilateral.

Penelitian *post test only control group design* ini pada 30 ekor tikus jantan galur Wistar berumur 2-3 bulan yang dirandom menjadi 5 kelompok dan diinduksi selama 14 hari. Kelompok tersebut diintervensi tiap hari selama 21 hari, yaitu KK1 (diet standar), KK2 (2,7 mg irbesartan), KP1 (0,675 ml madu dan 0,1 ml habbatussauda), KP2 (1,35 ml madu dan 0,2 ml habbatussauda), dan KP3 (2,7 ml madu dan 0,4 ml habbatussauda). Preparat ginjal Sirius red difoto 5x secara acak pada perbesaran 400x. Persentase fraksi area fibrosis ginjal dengan *software* Image J 52. Hasil diuji Kruskal wallis dan Mann Whitney.

Persentase fraksi area fibrosis ginjal pada kelompok KK1, KK2, KP1, KP2, dan KP3 masing-masing sebagai berikut : 0%, 2%, 7%, 5,5%, dan 1,5%. Hasil Kruskal wallis didapatkan $p = 0,000$. Uji Mann-Whitney diperoleh hasil berbeda secara signifikan pada seluruh pasangan kelompok KP terhadap KK ($p < 0,05$) kecuali KP3 terhadap KK2 ($p = 0,241$).

Kombinasi madu dan habbatussauda berpengaruh terhadap persentase fraksi area fibrosis ginjal pada tikus yang diinduksi obstruksi ureter unilateral dimana dosis tinggi kombinasi lebih baik dibandingkan dosis tengah dan dosis rendah terhadap irbesartan.

Kata Kunci: Obstruksi Ureter Unilateral, Madu, Habbatussauda, Fraksi Area, Fibrosis Ginjal

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Fibrosis ginjal merupakan gambaran akhir gagal ginjal kronik yang dapat berupa fibrosis tubulointerstitial dan glomerulosklerosis (Cho, 2010). Fibrosis ginjal ditandai adanya peningkatan matriks ekstraseluler secara berlebihan pada interstisial ginjal terutama kolagen tipe I dan III (Hong *et al.*, 2019). Sebagian besar kolagen dihasilkan dari miofibroblas baik dari hasil proliferasi atau diferensiasi dari sel lain dimana sekitar 50% dari fibroblas residen lokal, 35% dari sumsum tulang, 10% dari EndMT, dan 5% dari proses EMT (Lebleu *et al.*, 2014). Dalam penelitian Hosseinian (2019), habbatussauda dapat mengatasi fibrosis ginjal karena efeknya yang dapat menurunkan ekspresi TGF- β 1, kolagen VI, dan angiotensin II terhadap akibat obstruksi ureter dibandingkan losartan dan captopril. Madu juga diketahui dapat mengurangi fibrosis interstisial dengan cara menurunkan ekspresi α -SMA dan sel fibroblas stroma, serta menurunkan ekspresi TGF- β 1 yang dihasilkan oleh sel residen terutama makrofag (Ibrahim *et al.*, 2016). Pada penelitian terbaru diketahui bahwa kombinasi kedua bahan alami tersebut memiliki efek yang lebih menguntungkan terhadap kerusakan oksidatif pada jaringan ginjal akibat cisplatin karena diketahui antioksidan dan konsentrasi fenol lebih tinggi dibandingkan pemberian secara tunggal (Noviana *et al.*, 2020). Kombinasi madu dan habbatussauda akan digunakan pada penelitian ini karena kedua bahan tersebut diduga memiliki efek

sinergis terhadap fibrosis pada ginjal yang diinduksi dengan obstruksi ureter unilateral.

Gagal ginjal kronik merupakan salah satu masalah kesehatan dunia yang mempunyai prognosis buruk (Hatta *et al.*, 2019). Di dunia, gagal ginjal kronik memiliki prevalensi 11-13%. Sementara itu, prevalensi gagal ginjal kronik di Indonesia meningkat seiring dengan pertambahan usia, diantaranya sebesar 0,3 % kelompok usia 25-44 tahun, 0,4 % kelompok usia 45-54 tahun, 0,5 % kelompok usia 55-74 tahun, dan tertinggi 0,6 % pada kelompok usia 75 tahun. Prevalensi tertinggi juga diketahui pada laki-laki dibandingkan perempuan. Data hasil Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) tahun 2018 menunjukkan bahwa prevalensi gagal ginjal kronik di Indonesia pada usia 15 tahun sebesar 3,8 % (Hatta *et al.*, 2019). Pada gagal ginjal kronik stadium 5 perlu dilakukan terapi pengganti fungsi ginjal meliputi dialisis peritoneal, hemodialisis, dan transplantasi ginjal yang memerlukan biaya yang cukup besar. Pasien yang menjalankan hemodialisis mempunyai lama hidup sekitar 6-12 bulan (Kemenkes RI, 2017)..

Obstruksi ureter unilateral menyebabkan peningkatan tekanan intratubular dan peregangan sel tubulus secara mekanik sehingga memicu pengaktifan RAS terutama angiotensin II yang berperan penting dalam menginisiasi perkembangan fibrosis ginjal karena mengaktivasi faktor profibrotik. Sebagian besar sel tubulus dan sel interstisial ginjal akan mengekspresikan TGF- β 1 yang akan menghambat pengekspresian matriks metaloproteinase dan memicu infiltrasi sel inflamasi, proliferasi fibroblas,

serta kolagen III dan IV akan terakumulasi di ginjal yang terobstruksi (Hosseinian *et al.*, 2019). Pemberian habbatussauda dan madu secara tunggal masing-masing dengan dosis 10 mg/kg dan 20 mg/kg dapat memperbaiki struktur ginjal (Ibrahim *et al.*, 2016; Hosseinian *et.al.*, 2019). Dalam penelitian Noviana (2020), kombinasi minyak habbatussauda dan madu memiliki efek yang bersinergis sangat kuat dengan dosis masing-masing, yaitu 2 ml/kg BB dan 7,4 ml/kg BB selama 21 hari terhadap kerusakan oksidatif pada ginjal yang diinduksi cisplatin pada hari ke 18. Hal tersebut dapat menurunkan progresifitas fibrosis karena adanya kandungan timokuinon pada habbatussauda yang menghambat stress oksidatif melalui peningkatan aktivitas enzim, serta flavonoid dalam habbatussauda dan madu sebagai pendonor elektron terhadap radikal bebas sehingga kedua bahan tersebut dapat digunakan sebagai antioksidan. Selain itu, kedua bahan tersebut dapat menurunkan malondialdehid (MDA) yang dapat menurunkan produksi matriks dan kolagen yang karena adanya penurunan aktivitas *tissue-inhibitory matrix metalloproteinase* (TIMP) dan peningkatan *matrix metalloproteinase* (MMP) (Safithri *et al.*, 2018).

Peneliti akan menyelidiki pengaruh kombinasi madu dan habbatussauda terhadap persentase fraksi area fibrosis ginjal pada tikus yang diinduksi obstruksi ureter unilateral karena belum ada penelitian yang membahas mengenai efek sinergis kombinasi tersebut untuk mencegah progresifitas fibrosis ginjal. Jadi, penelitian ini mengharapkan kombinasi tersebut memiliki efek lebih baik dalam fibrosis ginjal.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah kombinasi madu dan habbatussauda berpengaruh terhadap persentase fraksi area fibrosis ginjal?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh kombinasi madu dan habbatussauda terhadap persentase fraksi area fibrosis ginjal yang diinduksi obstruksi ureter unilateral.

1.3.2. Tujuan Khusus

1.3.2.1. Mengetahui persentase fraksi area fibrosis ginjal pada tikus galur Wistar yang diinduksi obstruksi ureter unilateral dengan pemberian kombinasi madu dan habbatussauda pada variasi dosis.

1.3.2.2. Mengetahui persentase fraksi area fibrosis ginjal pada tikus galur Wistar yang diinduksi obstruksi ureter unilateral pada kelompok kontrol.

1.3.2.3. Mengetahui perbedaan pengaruh dosis kombinasi madu dan habbatussauda terhadap persentase fraksi area fibrosis ginjal yang diinduksi obstruksi ureter unilateral.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Hasil penelitian ini diharapkan menjadi dasar penelitian mengenai pengaruh kombinasi madu dan habbatussauda terhadap persentase fraksi area fibrosis ginjal.

1.4.2. Manfaat Praktis

Memberikan wawasan kepada masyarakat umum tentang madu dan habbatussauda yang bermanfaat dalam mencegah fibrosis ginjal.



BAB II

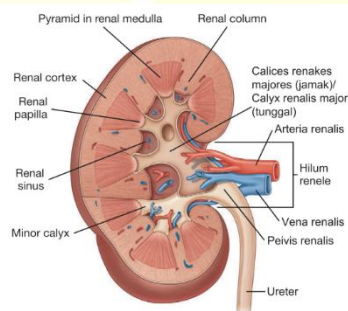
TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Fibrosis Ginjal

2.1.1. Anatomi, Fisiologi, dan Histologi Ginjal

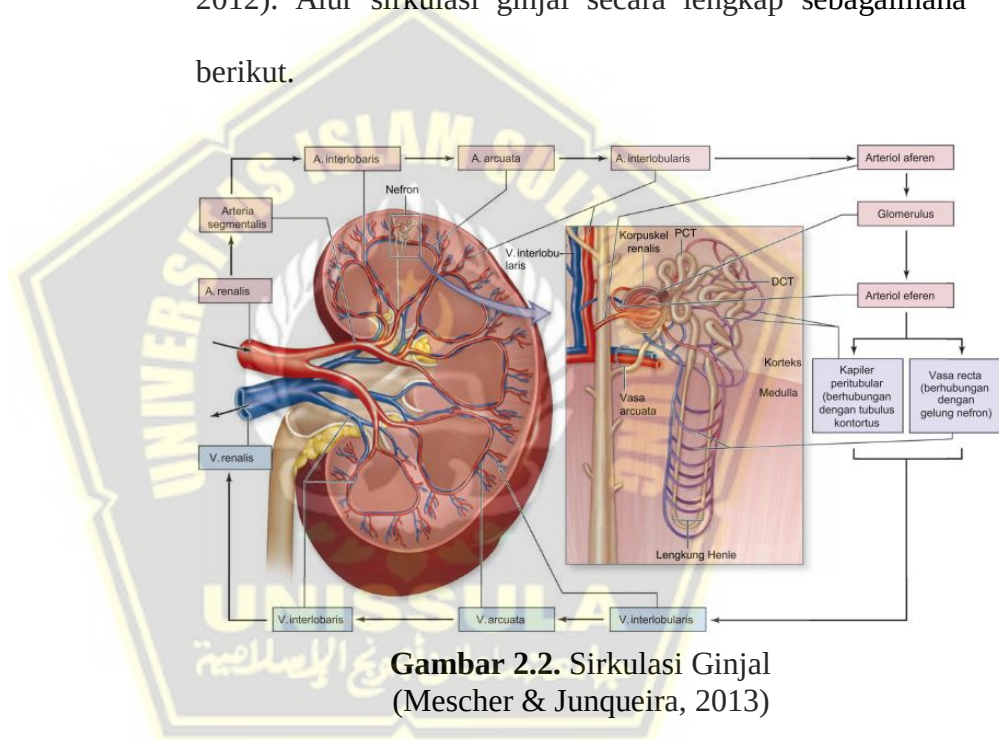
2.1.1.1. Anatomi

Ginjal termasuk organ urinaria yang menyerupai kacang berwarna coklat kemerahan (Moore *et al.*, 2014). Sepasang ginjal berada di rongga retroperitoneal. Ginjal kanan memiliki posisi lebih rendah dibandingkan ginjal kiri. Ginjal terbagi menjadi 2 polus dan 2 permukaan, yaitu polus superior, polus inferior, facies anterior, dan facies posterior. Bagian medial ginjal ada hilus renalis yang dilalui vasa renalis, vasa limfatik, saraf, dan saluran kemih. Pada bagian dalam ginjal tampak korteks renalis dan medulla renalis. Pada apeks papilla ginjal berlanjut sebagai kaliks renalis minor, kalik renalis mayor, dan pelvis renalis yang akan menyalurkan urin (Drake *et al.*, 2012).



Gambar 2.1. Struktur Ginjal
(Drake *et al.*, 2012)

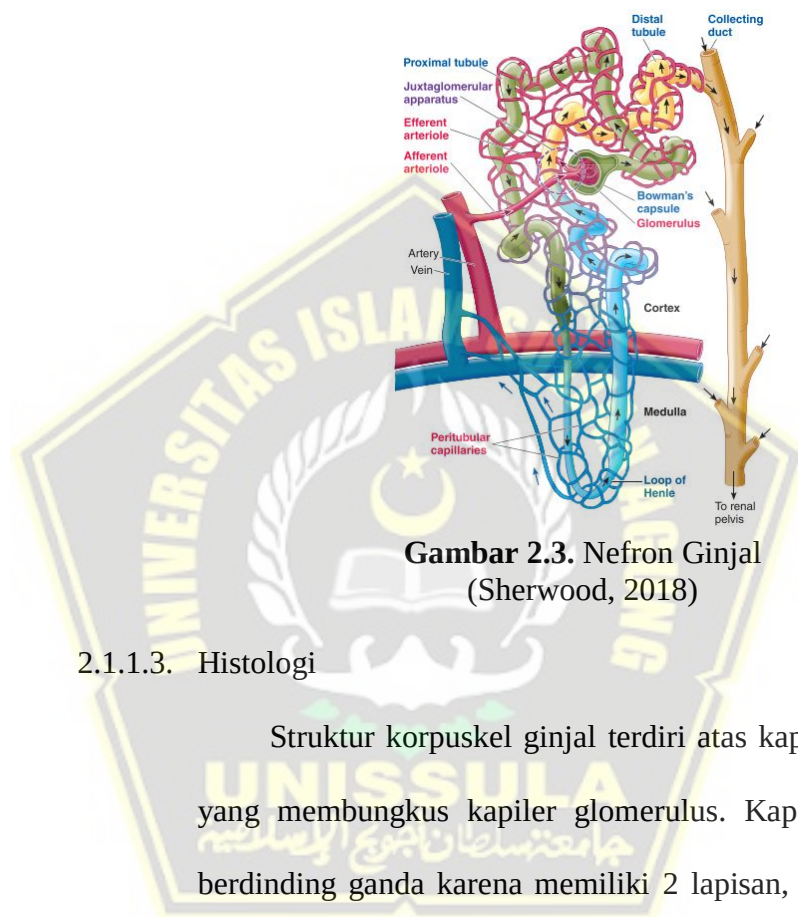
Ginjal divaskularisasi oleh arteri renalis. Arteri renalis kanan berada di belakang vena cava inferior sehingga tampak lebih panjang dan arteri renalis kiri tampak agak lebih tinggi. Aliran darah dilanjutkan ke vena renalis yang berada di anterior arteri renalis. Sebaliknya, vena renalis kiri lebih panjang yang melalui anterior aorta abdominal dan posterior arteri mesenterika superior (Drake *et al.*, 2012). Alur sirkulasi ginjal secara lengkap sebagaimana berikut.



2.1.1.2. Fisiologi

Ginjal berfungsi dalam menjaga keseimbangan air, asam dan basa, mengeluarkan sisa-sisa metabolisme dan toksin, mengatur tekanan darah melalui sistem renin–angiotensin–aldosterone, menghasilkan hormon kalsitriol dan eritropoietin, serta mengatur proses glukoneogenesis

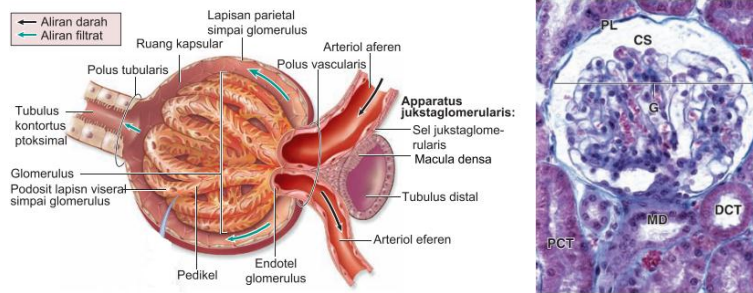
(Sherwood, 2018). Selain itu, ginjal berperan penting dalam pembentukan urin yang melibatkan glomerulus dan tubulus masing-masing dalam proses filtrasi, reabsorpsi dan sekresi dimana ketiga komponen tersebut termasuk dalam unit fungsional yang disebut sebagai nefron (Sherwood, 2018).



Gambar 2.3. Nefron Ginjal
(Sherwood, 2018)

2.1.1.3. Histologi

Struktur korpuskel ginjal terdiri atas kapsul Bowman yang membungkus kapiler glomerulus. Kapsul Bowman berdinding ganda karena memiliki 2 lapisan, yaitu lapisan viseral yang berepitel selata arau kompleks dan lapisan parietal berepitel skuamosa. Ada ruang kapsular di antara kedua lapisan tersebut yang berfungsi sebagai penampung hasil filtrasi. Glomerulus tersusun atas diafragma, membran basal, dan endotel kapiler berfenestra yang berperan sebagai sawar filtrasi (Mescher & Junqueira, 2013).



Gambar 2.4. Struktur Korpuskel Ginjal
(Mescher & Junqueira, 2013)

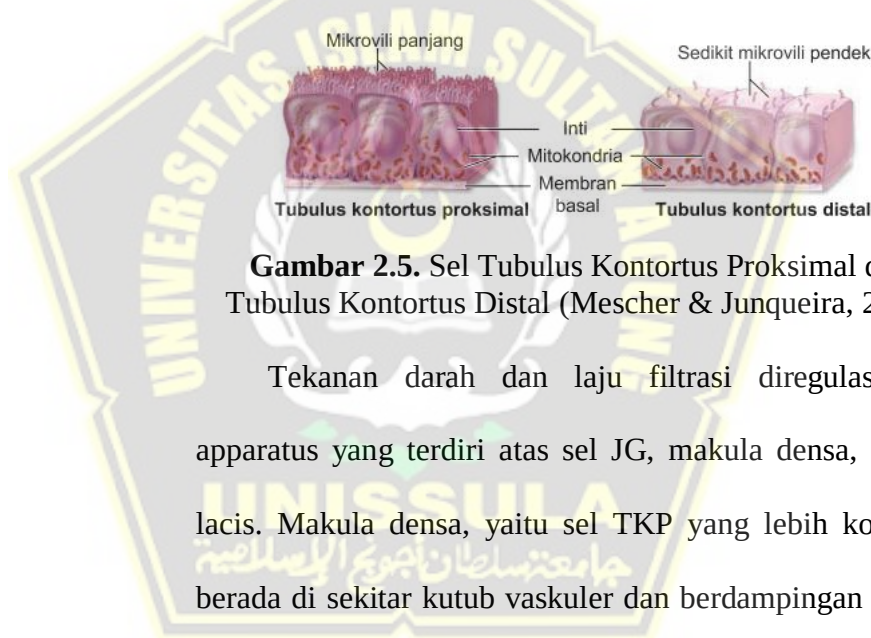
Keterangan :

Lapisan parietal (LP); ruang kapsuler (CS); glomerulus (G); makula densa (MD); tubulus kontortus proksimal (PCT); tubulus kontortus distal (DCT).

Sel mesangial yang dapat ditemukan di glomerulus berfungsi dalam produksi matriks yang mengelilingi sel itu sendiri. Kedua komponen tersebut disebut mesangium yang berperan dalam menyokong kapiler glomerulus, memperbaiki glomerulus, fagositosis perlekatan protein pada glomerulus dan kompleks antibodi-antigen, mempengaruhi tekanan darah akibat adanya sifat kontraktil, dan memelihara kekebalan dengan cara eliminasi zat, seperti prostaglandin dan sitokin (Mescher & Junqueira, 2013).

Tubulus renalis dibagi menjadi beberapa bagian yang meliputi tubulus kontortus distal (TKD), ansa Henle, dan tubulus kontortus proksimal (TKP). Sel TKP berukuran besar dengan epitel kuboid simpleks, terdapat banyak mitokondria, dan memiliki *brush border*. Ansa Henle

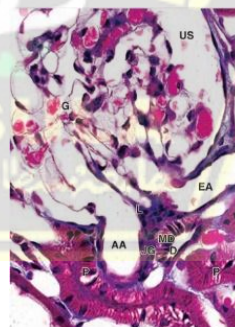
berepitel skuamosa simpleks dan dibagi menjadi pars desenden dan asenden. Pars asenden memiliki epitel kuboid simpleks dan memiliki bagian lurus yang tipis dan tebal. TKD memiliki ciri-ciri, diantaranya memiliki sel agak lebih kecil dengan epitel kuboid simpleks dan lumen tampak bersih karena tidak ada *brush border*, serta kurang asidofilik akibat sedikit mengandung mitokondria (Mescher & Junqueira, 2013). TKP dan TKD dapat dibedakan berdasarkan gambar berikut.



Gambar 2.5. Sel Tubulus Kontortus Proksimal dan Tubulus Kontortus Distal (Mescher & Junqueira, 2013)

Tekanan darah dan laju filtrasi diregulasi oleh apparatus yang terdiri atas sel JG, makula densa, dan sel lacis. Makula densa, yaitu sel TKP yang lebih kolumnar berada di sekitar kutub vaskuler dan berdampingan dengan tunika media arteriol aferen yang telah termodifikasi. Struktur ini berperan sebagai pemantau konsentrasi Na^+ dan Cl^- . Peningkatan arterial dapat memengaruhi tekanan kapiler glomerulus dan berlanjut terjadi peningkatan laju filtrasi dimana makula densa akan mendeteksi adanya peningkatan kadar ion. Sementara itu, arteriol aferen akan

berkontraksi untuk membantu penurunan tekanan tersebut. Sel granular jukstaglomerular (JG) berasal dari sel otot polos termodifikasi. Berbeda dengan mekanisme di atas, apabila terjadi penurunan tekanan arteri, maka apparatus jukstaglomerular sebagai baroreseptor akan menjalankan fungsinya dengan mensekresi renin. Renin akan memicu perubahan angiotensinogen yang dihasilkan paru menjadi angiotensin I. Selanjutnya, angiotensin I akan dirubah menjadi angiotensin II oleh *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE). Angiotensin II berfungsi sebagai vasokonstriktor dan dapat memicu sekresi aldosteron oleh kelenjar adrenal sehingga terjadi peningkatan reabsorpsi Na^+ dan air pada tubulus kontortus distal dan tubulus kolektivus (Mescher & Junqueira, 2013).

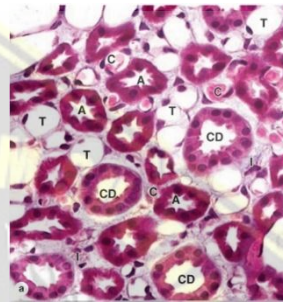


Gambar 2.6. Apparatus Jukstaglomerular (Mescher & Junqueira, 2013)

Keterangan :

Pewarnaan Trikom Mallory dengan perbesaran 400x. Tubulus distal (D), kutub vaskular glomerulus (G), makula densa (MD), jukstaglomerular (JG), arteriol aferen (AA), arteriol eferen (EA), sel granul, sel lacis (L), tubulus proksimal (P), ruang perkemihan (US)

Duktus koligentes dilapisi epitel kuboid simpleks (Mescher & Junqueira, 2013). Duktus koligentes memiliki 2 sel yang penting, yaitu sel interkalatus dan sel prinsipal. Sel interkalatus terpusat lebih gelap dan berperan dalam menjaga keseimbangan asam-basa, sedangkan sel principal terpusat pucat dan berfungsi dalam mengatur keseimbangan air. (Mescher & Junqueira, 2013).



Gambar 2.7. Duktus Koligentes dan Ansa Henle (Mescher & Junqueira, 2013)

Keterangan :

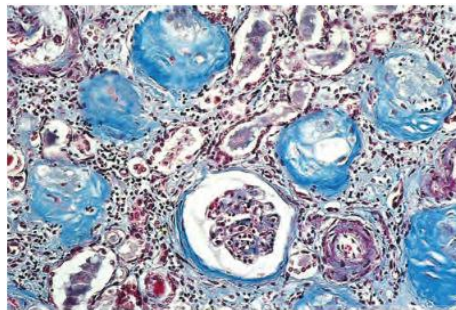
Segmen tebal asendens (A), segmen tipis desendens (T), duktus koligentes (CD), kapiler vasa recta yang paralel (C), interstisium (I).

2.1.2. Definisi dan Patomekanisme Fibrosis Ginjal

2.1.2.1. Definisi

Fibrosis ginjal adalah gambaran akhir dari gagal ginjal kronik yang ditandai adanya akumulasi matriks ekstraseluler secara berlebihan termasuk kolagen I dan III pada interstitium ginjal sehingga timbul jaringan parut sebagai pengganti dari jaringan fungsional (Cho, 2010). Sebagian besar kolagen dihasilkan dari proliferasi miofibroblas ataupun diferensiasi sel lain dimana sekitar

50% berasal dari fibroblas residen lokal, dan sisanya 35% dari sumsum tulang, 10% dari EndMT, serta 5% dari proses EMT (Lebleu *et al.*, 2014)

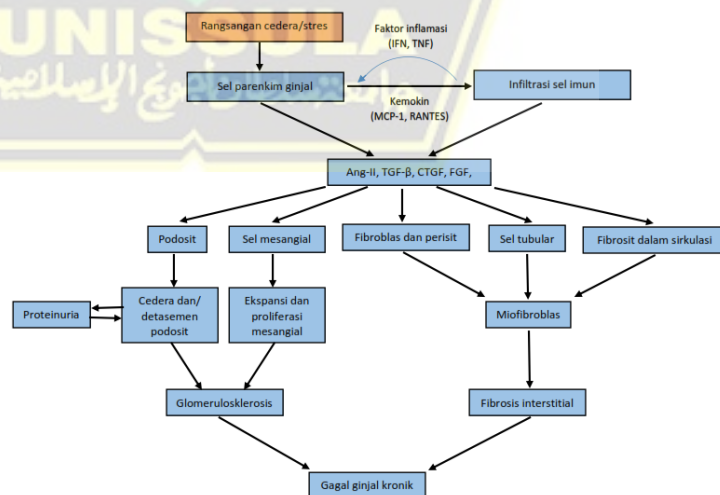


Gambar 2.8. Fibrosis ginjal
(Kumar et al., 2015)

Keterangan :
Pewarnaan Masson trikrom menampakkan glomerulus terlingkupi oleh kolagen (biru).

2.1.2.2. Patomekanisme

Fibrosis ginjal dibagi dalam 2 proses dari gagal ginjal kronik, yaitu glomerulosklerosis dan fibrosis tubulointerstitial sebagaimana berikut.



Gambar 2.9. Perkembangan Penyakit Ginjal Kronis secara Seluler
(Ren & Dai, 2020)

1. Glomerulosklerosis

Fungsi sawar filtrasi glomerulus yang abnormal dan proliferasi sel mesangial memicu perkembangan glomerulosklerosis (Ren & Dai, 2020). Faktor pengaruh lainnya, yaitu hipertensi, endapan kompleks imun, dan dislipidemia dapat menimbulkan cedera glomerulus yang memicu pelepasan sitokin dan kemokin. Selanjutnya, sel inflamasi menginfiltrasi dan mensekresi sitokin dan faktor pertumbuhan, diantaranya angiotensin, TGF- β 1, TNF, IFN- γ , FGF, dan PDGF. Hal ini menyebabkan hilangnya podosit, kapiler kolaps dan terjadi obliterasi, serta sel epitel parietal teraktivasi. Faktor profibrotik, seperti TGF- β , FGF 2, dan PDGF mengakibatkan proliferasi sel mesangial tinggi. Sel mesangial dapat berdiferensiasi menjadi mesangioblas dan menyebabkan produksi matriks secara berlebihan (Ren & Dai, 2020).

2. Cedera Podosit

Sawar filtrasi glomerulus tersusun atas podosit dan diafragma. Pertanda awal glomerulosklerosis segmental yaitu adanya adhesi dengan sel parietal akibat keterbukaan membran basal glomerulus yang awalnya tertutup. Selanjutnya, terjadi kebocoran protein

ke kapsul Bowman, kapiler menjadi kolaps dan hilangnya sel endotel. Akhirnya, keseluruhan akan menjadi rusak dan timbul sklerosis (Ren & Dai, 2020).

3. Ekspansi dan/ Proliferasi Mesangial

Aktivasi sel mesangial dan produksi mediator inflamasi terjadi karena ada timbunan kompleks imun IgA dalam mesangium. Selain itu, sel mesangial mengalami proliferasi yang tentunya menyebabkan peningkatan matriks. Mediator tersebut menyebabkan infiltrasi leukosit lokal yang dapat mempengaruhi selektivitas glomerulus terhadap protein (Ren & Dai, 2020). Selain itu, dapat memicu terjadinya proapoptosis dan profibrotik. Hal ini membentuk glomerulosklerosis nodular (Ren dan Dai, 2020).

4. Fibrosis Interstisial Ginjal

Awal kerusakan di interstisial dapat diidentifikasi dengan adanya akumulasi berlebihan oleh matriks ekstraseluler. Jalur seluler maupun molekul ikut berperan dalam aktivasi fibroblas hingga miofibroblas. Fibrosis interstisial ginjal melibatkan 4 fase. Pertama, hipoksemia, proteinuria, dan hiperglikemi dapat menyebabkan cedera pada sel-sel ginjal dan diperparah oleh infiltrasi sel-sel inflamasi akibat faktor-faktor

kemotaktik. Kedua, adanya infiltrasi sel – sel inflamasi memicu produksi senyawa ROS dan faktor protein seperti $\text{TNF-}\alpha$, MCP-1, $\text{TGF-}\beta$ 1, IL-1, CTGF, dan angiotensin II yang menstimulasi sel perisit, endotel, sel epitel tubular, dan fibroblast teraktivasi yang berperan dalam produksi matriks. Ketiga, sel-sel tersebut dapat berdiferensiasi menjadi miofibroblas serta memicu proses apoptosis dan atrofi tubulus ginjal. Keempat, akibat adanya gangguan proteolisis dalam mendegradasikan matriks sehingga timbul fibrosis dengan matriks yang kaku (Ren dan Dai, 2020).

a. Aktivasi Fibroblast dan Perisit

Fibroblast terdapat di ruang interstisial antara epitel dan kapiler yang berperan dalam memelihara struktur jaringan dan keseimbangan matriks. Fibroblas dapat berdiferensiasi menjadi miofibroblas akibat adanya profibrotik dan tekanan mekanik. Selain itu, cedera pada ginjal dapat memicu diferensiasi perisit menjadi miofibroblas sehingga menyebabkan ketidakstabilan mikrovaskular dan fibrosis interstisial ginjal (Ren & Dai, 2020).

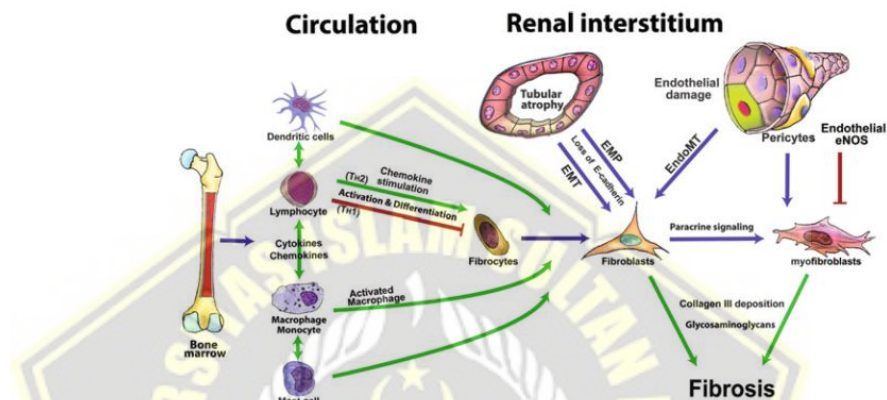
b. *Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT)*

Proses perubahan secara fenotipik ditandai adanya penambahan mesenkim dan kehilangan sel epitel disebut dengan *Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT)*. Matriks dihasilkan oleh sel yang berasal dari epitel tubulus. Tak jauh berbeda dengan *Endothelial-Mesenchymal Transition (EndoMT)* dimana merupakan sumber fibroblas ataupun miofibroblas terdapat pada endotel kapiler. Fungsi tubulus yang abnormal menandakan terjadinya proses EMT yang dapat berkembang menjadi fibrosis secara patologis (Ren & Dai, 2020).

c. Rekrutmen Fibroblas yang Bersirkulasi

Sumsum tulang memproduksi beberapa sel yang dapat berdiferensiasi menjadi sel fibrosit dan bersirkulasi melalui pembuluh darah perifer. Matriks dihasilkan oleh fibrosit, seperti vimentin dan kolagen. Fibrosit dapat ditunjukkan dengan adanya kolagen tipe I atau prokolagen 1. Perlu diketahui bahwa fibrosit dapat berasal dari fibroblast, makrofag, ataupun monosit,. Peradangan yang terjadi di awal cedera diperoleh adanya sitokin

kompleks (sitokin profibrotik, seperti IL-13 dan IL-4) yang memicu diferensiasi monosit Gr1+ menjadi fibrosit yang dibantu oleh CD4+T. Akhirnya, fibrosit akan berpindah ke jaringan ginjal dan ikut terlibat dalam proses fibrosis ginjal (Ren & Dai, 2020).



Gambar 2.10. Keterlibatan Sel-Sel dalam Fibrosis Interstisial (Patel & Preedy, 2016)

2.1.3. Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Fibrosis Ginjal

2.1.3.1. Hipertensi

Adanya perubahan sistemik baik makrovaskuler atau mikrovaskuler pada ginjal menyebabkan ginjal kehilangan autoregulasi terhadap peningkatan kapiler intraglomerulus dan cedera akibat hiperfiltrasi. Protein trans glomerular yang hilang akibat hiperfiltrasi menginduksi pelepasan sitokin, faktor pertumbuhan dari sel mesangial dan sel epitel tubulus yang dapat menyebabkan hilangnya vasodilator dan disfungsi endotel. Hal ini juga memicu

sistem renin angiotensin dan terjadi perekrutan sel inflamasi, serta peningkatan pelepasan sitokin. Selanjutnya, akan terjadi apoptosis yang menyebabkan kehilangan sel ginjal yang normal dan peningkatan produksi matriks yang menjadi dasar terbentuknya fibrosis (Morgado & Leo, 2012).

2.1.3.2. Diabetes

Hiperglikemia dapat menyebabkan hiperfiltrasi, peningkatan reabsorpsi dan natrium klorida sehingga terjadi penurunan natrium klorida ke makula densa yang akan menyebabkan arteriol aferen berdilatasi. Sebaliknya, arteriol eferen menyempit akibat pengaruh angiotensin II yang tinggi. Hal ini juga berkaitan dengan hipertensi. Selain itu, hiperinsulinemia juga dapat menyebabkan disfungsi endotel, cedera podosit, stress oksidatif, peradangan, dan fibrosis (Lin *et al.*, 2018).

2.1.3.3. Iskemia

Iskemia juga berkaitan dengan diabetes dan hipertensi dimana adanya lesi pada glomerulus dan vaskuler akibat hiperglikemia menyebabkan hipoksia pada tubulus dan medula ginjal. Oksigen yang tidak cukup dan produksi radikal bebas yang berlebihan dapat merusak jaringan ginjal. Hipoksia sebenarnya dapat diatasi oleh *Hypoxia-*

Inducible Factor (HIF), tetapi stabilitas HIF terganggu akibat hiperglikemia sehingga hal ini dapat memicu terbentuknya fibrosis pada ginjal (Lin *et al.*, 2018).

2.1.3.4. Imun

Stres yang diakibatkan diabetes dapat memicu produksi proinflamasi dari sel ginjal. Adanya pelepasan kemokin, *cell adhesion molecules* (CAMs), dan *danger associated molecular patterns* (DAMPs) akan memfasilitasi respon imun bawaan terutama perekrutan makrofag yang berperan penting dalam proses akumulasi kolagen (Lin *et al.*, 2018).

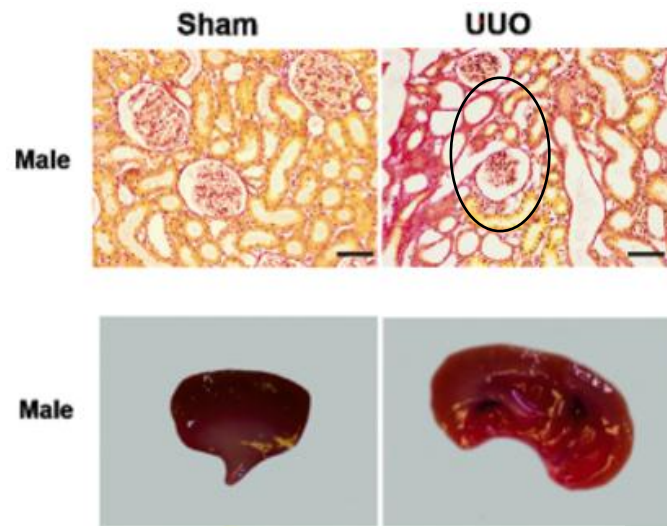
2.1.3.5. Toksin

Toksin metabolik dapat mengakibatkan fibrosis pada ginjal. Mekanisme yang berhubungan juga dengan diabetes dimana terjadi kelebihan mitokondria akibat hiperglikemia yang dapat memicu pembentukan ROS sehingga merusak dan menyebabkan apoptosis pada podosit. Selain itu, disfungsi protein juga dapat terjadi yang merusak metabolisme matriks ekstraseluler (Lin *et al.*, 2018).

2.1.4. Efek Obstruksi Ureter Unilateral pada Histopatologi Ginjal

Obstruksi ureter unilateral merupakan metode yang banyak digunakan untuk model fibrosis pada ginjal tikus dimana salah satu ureter diligasi dengan benang silk dan biasanya pada ureter kiri pada

hewan jantan karena organnya tidak menyulitkan saat proses pembedahan (Martínez-Klimova *et al.*, 2019). Keuntungan metode ini dibandingkan metode lain, yaitu tidak menyebabkan adanya toksin eksogen, menurunkan kondisi uremik, dan menyediakan kontrol berupa ginjal kontralateral (Chevalier *et al.*, 2009). Metode ini menyebabkan perubahan struktur secara histologis, seperti tubulus atrofi, tubulus berdilatasi dan berbentuk kistik, penurunan jumlah tubulus, sel epitel tubulus mengalami apoptosis, matriks ekstraseluler terakumulasi, dan fibrosis tubulointerstitial. Pewarnaan Sirius red dapat memperlihatkan area positif fibrosis dengan adanya deposisi kolagen di sekitar glomeruli dan area tubulointerstitial pada ginjal yang diligasi (Martínez-Klimova *et al.*, 2019). Berdasarkan uji pendahuluan, metode obstruksi ureter unilateral diketahui menyebabkan persentase fibrosis yang cukup tinggi sekitar 53%. Ketebalan kolagen dapat dinilai berdasarkan perubahan warna mulai dari ketebalan tipis hingga tebal, yaitu hijau, kuning, oranye, dan merah (Fischer *et al.*, 2018). Ginjal tikus secara makroskopis setelah obstruksi ureter unilateral selama 7 hari tampak bengkak dan kemerahan yang menandakan adanya inflamasi (Tingskov *et al.*, 2021).



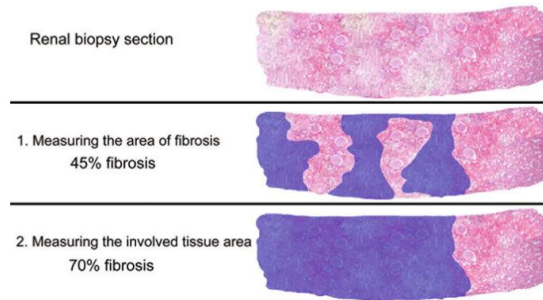
Gambar 2.11. Gambaran Mikroskopis dan Makroskopis Ginjal dengan *Sham Operation* dan UUO (Tingskov *et al.*, 2021)

Keterangan :

Area fibrosis ditandai lingkaran hitam.

2.1.5. Penilaian Fibrosis Ginjal

Penilaian fibrosis ginjal dapat berdasarkan persentase area fibrosis. Hal ini diketahui ada 2 pendapat ahli patologi yang berbeda. Sebagian ahli menilai persentase fibrosis interstisial berdasarkan keseluruhan jaringan yang ada matriks fibrosis. Sedangkan, sebagian lain berpendapat penilaian mencakup satu kesatuan dari glomerulus dan tubulus, serta matriks fibrotik (Patel & Preedy, 2016). Pada penelitian ini menggunakan pendapat ahli pertama. Pewarnaan Sirius red memudahkan dalam menentukan persentase fraksi area fibrosis ginjal (%).



Gambar 2.12. Penilaian Fibrosis Interstisial dengan Pewarnaan Sirius red (Patel & Preedy, 2016)

2.2. Habbatussauda

2.2.1. Klasifikasi

Dalam *International Taxonomic Information System* tahun 2011, penamaan habbatussauda atau jinten hitam diketahui sebagaimana berikut :

Kingdom : *Plantae*
 Divisi : *Tracheophyta*
 Subdivisi : *Spermatophytina*
 Kelas : *Magnoliopsida*
 Ordo : *Ranunculales*
 Famili : *Ranunculaceae*
 Genus : *Nigella*
 Spesies : *Nigella sativa*
 Binomial : *Nigella sativa* Linn.

2.2.2. Deskripsi Habbatussauda

Nigella sativa adalah tanaman obat yang memiliki nama berbeda-beda tiap negara, seperti di Inggris (*Black Cumin*), di Asia

Selatan (Kalonji), dan di Arab (habbatussaуда) (Nadkarni, 1976; Ping *et al.*, 2014). Indonesia dikenal dengan sebutan jinten hitam yang biasa didapatkan dari India dan Mesir (Ravindra, 2017; Setiawati *et al.*, 2018). Tanaman ini dapat tumbuh subur di Mediterania Selatan dan beberapa negara Timur Tengah (Tariq, 2008; Ping *et al.*, 2014). Selain itu, tanaman ini di India bagian utara dapat tumbuh dengan baik (Paarakh, 2010; Ravindra, 2017).



Gambar 2.13. Tumbuhan Habbatussauda
(Kooti *et al.*, 2016)

Nigella sativa dapat tumbuh di musim dingin pada suhu optimal 15°C dengan lingkungan yang mendapatkan sinar matahari penuh dan pada pH 6-7. Tanaman ini sangat sesuai tumbuh di tanah lempung berpasir dan tanah kering (Rashid *et al.*, 2021). Walaupun demikian, tanaman ini perlu disiram secara teratur bila terjadi kekeringan yang cukup lama (Paarakh, 2010). Tinggi tanaman dewasa dapat mencapai 30-68 cm atau 52 cm (Benkaci-Ali *et al.*, 2007). Tanaman ini termasuk famili *Ranunculaceae* yang memiliki akar dapat berupa umbi akar, akar serabut, ataupun akar tunggang (Rashid *et al.*, 2021). Batangnya yang awal ramping, tegak, dan hijau kilap akan ditemukan adanya lubang dan berubah menjadi hijau gelap saat umur tua (KÖKDİL *et al.*, 2006). Daunnya dengan bentuk

menyirip (Datta *et al.*, 2012). Bunganya dapat berwarna merah muda, putih, kuning, biru pucat, ataupun ungu pucat pada posisi rendah dengan jumlah kelopak sekitar 5-10 (Ahmad *et al.*, 2013; Kooti *et al.*, 2016). Buahnya besar tersusun bertumpuk dan di dalamnya mengandung biji kecil dengan ciri-ciri berupa jenis dikotil dan berbentuk bulat telur ataupun segitiga dengan sudut yang tajam, serta sedikit berbau dan terasa pahit. Warna bijinya dari luar dan dalam secara berurutan, yaitu hitam dan putih (Rajsekhar & Kuldeep, 2011).



Gambar 2.14. Biji Habbatussauda
(Rashid *et al.*, 2021)

2.2.3. Kandungan Habbatussauda

Bagian dari tanaman habbatussauda yang biasanya digunakan sebagai obat tradisional oleh masyarakat umum adalah bijinya. Bijinya mengandung nutrisi tinggi berupa 28,5 % lemak, 26,7 % protein, 24,9 % karbohidrat, dan 8,4 % serat kasar, serta 4,8 % abu (Rashid *et al.*, 2021). Sementara itu, komponen aktif yang berperan penting dalam terapeutik, yaitu timokuinon, timohidrokuinon, ditimokuinon, karvakrol, p-kimena, t-anetol, timol, 4 terpineol, dan α -pinena (Ali & Blunden, 2003). Selain itu, habbatussauda dapat sebagai antioksidan kuat karena mengandung beberapa senyawa,

seperti flavonoid, alkaloid, minyak atsiri, glikosida, dan saponin (Alsuhaibani, 2018). Bijinya dapat digunakan dalam berbagai sediaan, seperti minyak, serbuk, ataupun ekstrak. Sediaan serbuk diketahui tinggi protein, karbohidrat, dan serat. Sementara, sediaan ekstrak mengandung senyawa utama berupa timokuinon. Sedangkan, sediaan minyak terdapat beberapa komponen bioaktif yang berperan penting dalam menjaga fungsi ginjal, seperti timokuinon, ditimokuinon, timo hidrokuinon, dan timol (Alsuhaibani, 2018).

2.3. Madu

2.3.1. Deskripsi Madu

Madu merupakan zat manis berupa nektar atau *honeydew* yang dihasilkan oleh lebah. Madu diketahui tidak cepat busuk. Kebanyakan nektar berasal dari bunga dan sisanya didapatkan dari ekstrafloral, seperti dari tanaman kapas dan karet. (Crane & Visscher, 2009).

Madu merupakan produk yang didapatkan dari hutan bukan kayu (Aidah, 2020). Beberapa daerah di Indonesia terkenal menghasilkan madu hutan, diantaranya di Sumbawa, Kawasan Hutan Taman Nasional Tesso Nilo di Provinsi Riau, Kalimantan Barat, dan Sulawesi Tenggara, serta Sulawesi Selatan (Aidah, 2020). Rasa madu hutan diketahui tergantung dari asal nektar mulai dari rasa manis hingga pahit (Evahelda *et al.*, 2017).

Madu terdapat 2 macam yang berdasarkan asal nektarnya. Pertama, madu monoflora yang berasal dari 1 tumbuhan dengan rasa, warna, dan wanginya spesifik, serta sering dinamakan sesuai asal nektar tanamannya, seperti madu rambutan, madu kelengkeng, dan madu randu. Kedua, madu multiflora berasal dari lebih 1 jenis tumbuhan bunga dan sering diproduksi oleh lebah hutan sehingga dinamakan berdasarkan nama tempatnya, seperti madu Timor, madu Sumbawa, dan madu Bangka (Andriani *et al.*, 2012; Hudri, 2014). Madu Pramuka termasuk madu multiflora yang digunakan dalam penelitian ini dikarenakan kaya akan senyawa bioaktif (Nadhilla, 2014).

2.3.2. Kandungan Madu

Kandungan madu dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya jenis sumber bunga dan spesies lebah, iklim dan wilayah geografis, serta cara pengolahan dan penyimpanannya. Madu memiliki 180 jenis senyawa yang berbeda-beda. Sebagian besar sumber energi berasal dari glukosa dan fruktosa yang menyebabkan madu tampak viskositas, higroskopisitas, dan granulasi. Saliva lebah madu (*Apis mellifera* L.) diketahui terdapat 50-85% asam amino terutama prolin yang digunakan sebagai penanda madu matang. Selain itu, madu juga mengandung sekitar 0,2 % mineral dan sedikit vitamin, serta enzim (Cianciosi *et al.*, 2018). Keasaman dan rasa madu dipengaruhi oleh asam organik yang rendah terkandung dalam

madu. (Cianciosi *et al.*, 2018). Senyawa terpenting pada madu sebagai antioksidan adalah fenolik yang termasuk dalam golongan non-flavonoid. Selain itu, madu juga mengandung flavonoid yang diketahui mudah larut air, seperti flavon, flavanon, flavanol, flavonol, isoflavon, antosianidin, dan chalcones (Cianciosi *et al.*, 2018).

2.3.3. Manfaat Madu

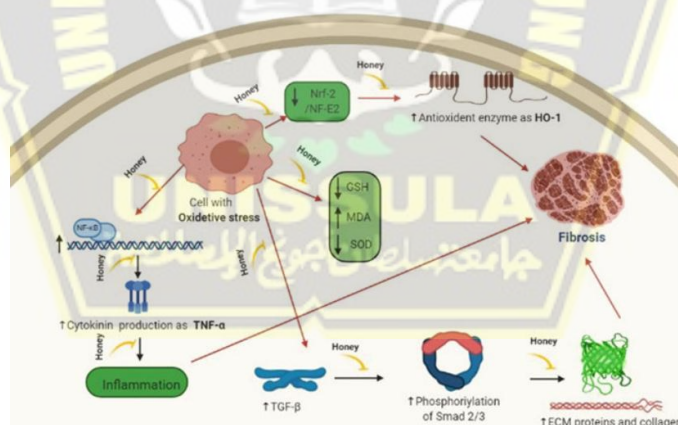
Madu dikenal sejak lama digunakan pengobatan alami dalam membantu regenerasi jaringan, penyembuhan luka, mengatasi saluran cerna dan radang gusi, serta fungsi lainnya. Senyawa fenolik dalam madu berefek sebagai antioksidan, antivirus, antidiabetes, antikanker antimikroba, dan antijamur, serta anti-inflamasi (Cianciosi *et al.*, 2018; Alvarez-Suarez, 2017). Madu juga diketahui dapat memelihara beberapa sistem organ, seperti sistem gastrointestinal, kardiovaskular, saraf, dan pernapasan (Cianciosi *et al.*, 2018).

2.3.4. Efek Farmakologi Madu

2.3.4.1. Antioksidan

Stres oksidatif merupakan hasil dari oksidan dan antioksidan yang tidak seimbang dan tentunya mengganggu fungsi secara fisiologis. *Reactive oxygen species* (ROS) dan radikal bebas termasuk dalam oksidan yang diproduksi

melalui reaksi di mitokondria, aktivitas sistem kekebalan, metabolisme obat, dan metabolisme asam lemak (Cianciosi *et al.*, 2018). Untuk mencegah kerusakan lebih lanjut akibat radikal bebas, maka diperlukan adanya antioksidan yang dapat diperoleh dari madu karena mengandung cukup senyawa flavonoid dan fenolik. Antioksidan berperan sebagai penyumbang elektron dan ion hidrogen (Rehman & Majid, 2020). Kandungan antioksidan yang tinggi diketahui pada madu yang berwarna gelap (Rehman & Majid, 2020). Selain itu, madu juga berperan sebagai anti-inflamasi yang melibatkan mekanisme penekanan *Cyclooxygenase-2* (COX-2) dengan mengubah sifat pro-inflamasi oleh senyawa madu (Rehman & Majid, 2020).



Gambar 2.15. Mekanisme Anti-Fibrotik Madu (Rehman & Majid, 2020)

2.3.4.2. Anti-Inflamasi

Inflamasi merupakan respon jaringan yang non-spesifik terhadap agen berbahaya (Majtan, 2014). Stres

oksidatif dapat memicu perkembangan peradangan lebih lanjut (Cianciosi *et al.*, 2018). Inflamasi dapat dikontrol dengan menghambat mediator inflamasi, seperti NO, sitokin, dan endotoksin. Hal ini dapat diatasi dengan anti-inflamasi berupa flavonoid dan fenolik yang terkandung dalam madu. Madu juga diketahui dapat mengurangi jaringan parut. Mekanisme anti-inflamasi, yaitu dengan penghambatan ROS, jalur komplemen klasik, dan infiltrasi leukosit, serta memicu pengekspresian sintase NO. Selain itu, kondisi yang sedang meradang dan terinfeksi dapat teratasi dengan madu karena melibatkan mekanisme penghambatan matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) yang menyebabkan degradasi matriks dan sitokin inflamasi tersupresi (Majtan, 2014).

2.3.4.3. Antidiabetes

Diabetes mellitus tipe 2 dapat diatasi dengan antiabetik yang melibatkan antioksidan dalam madu. Adanya peningkatan absorpsi glukosa pada otot dan sel lemak dapat menyebabkan ROS meningkat dan terjadi stres oksidatif yang tentunya akan mengganggu absorpsi glukosa dan pembentukan glikogen lebih lanjut. Selanjutnya, kerusakan jalur pensinyalan insulin dan sel β pankreas dapat timbul akibat adanya stres oksidatif yang

mempengaruhi pengeluaran insulin. Oleh sebab itu, madu diketahui juga sebagai antidiabetik melalui mekanisme antioksidan dimana terjadi penurunan indeks glikemik dan kadar glukosa plasma (Cianciosi *et al.*, 2018).

2.4. Hubungan Kombinasi Madu dan Habbatussauda terhadap Persentase Fraksi Area Fibrosis Ginjal

Dalam penelitian Ibrahim (2016), pemberian madu lebah dengan dosis 20 mg/kg mempunyai efek yang baik terhadap ginjal yang mengalami cedera subkronis yang diinduksi dengan cisplatin 1 mg/kg selama 10 Minggu. Hasil penelitian menunjukkan perbaikan minimal struktur ginjal, serta penurunan α -SMA dan TGF- β 1. Pada penelitian lain (Asfur & Sadewo, 2019), madu 1,35 mL/hari diberikan selama 14 hari dapat memperbaiki struktur dan fungsi ginjal tikus yang diinduksi tuak 2,5 mL/hari selama 15 hari. Selain itu, chrysin yang mengandung flavonoid tipe flavon dimana dapat berasal dari sarang lebah digunakan dalam penelitian lain sebagai agen renoprotektif. Chrysin 10 mg / kgBB yang diberikan secara oral tiap hari selama 10 minggu menunjukkan bahwa chrysin dapat mencegah fibrosis ginjal pada tikus diabetes karena dapat memengaruhi α -SMA tingkat jaringan dan FSP-1, menghambat sel tubular dalam produksi serat kolagen tipe IV sehingga tidak terakumulasi di ginjal dan mencegah migrasi sel epitel tubular. Selain itu, chrysin memengaruhi pengekspresian MT1-MMP yang membantu dalam degradasi matriks dan supresi TIMP-2 sehingga deposisi serat kolagen dan fibrosis dapat teratasi (Kang *et al.*, 2015).

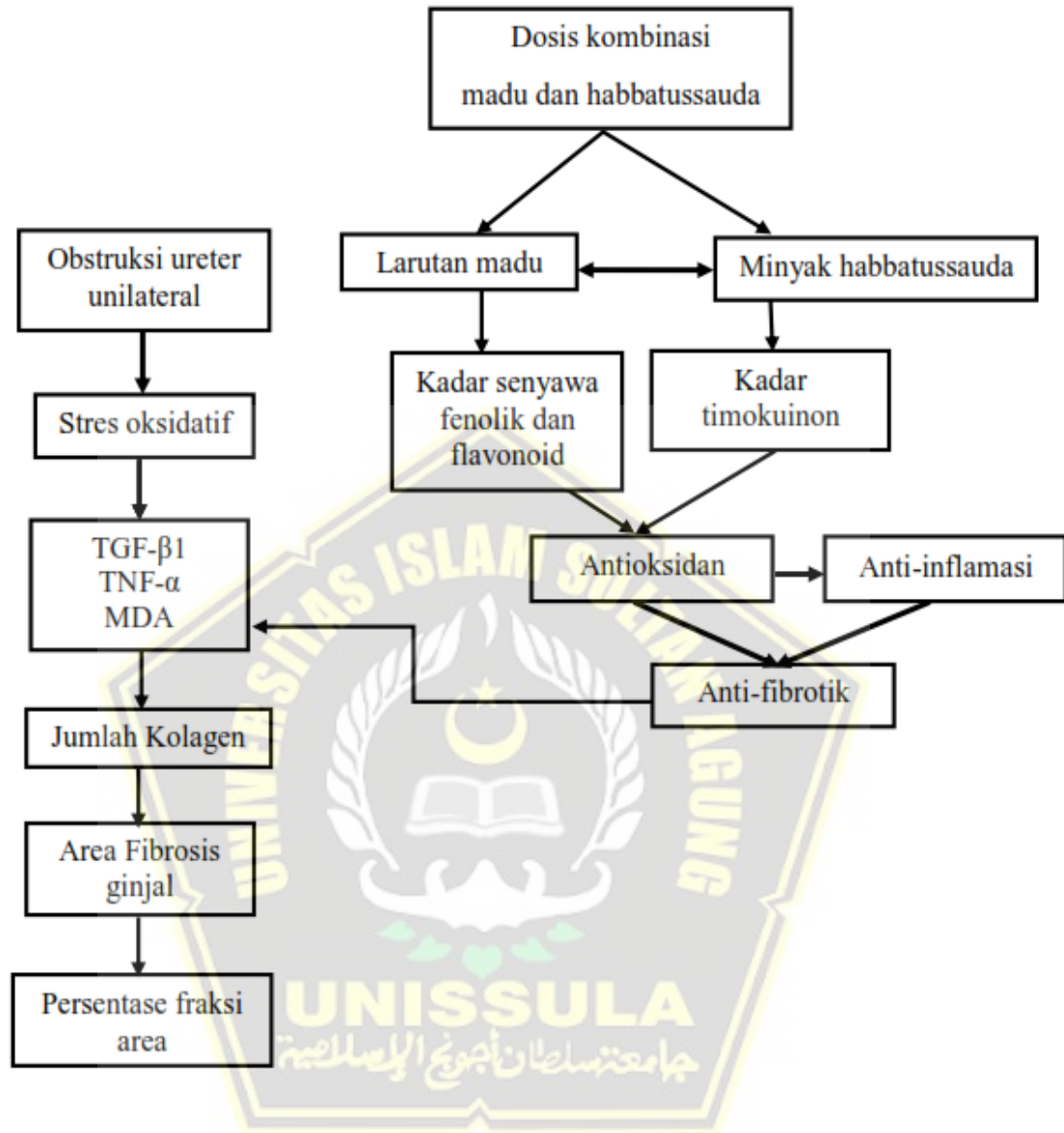
Pada penelitian Al-Gayyar (2016) menunjukkan bahwa pemberian *Nigella sativa Oil* (NSO) dengan dosis 5 dan 10 ml/kg terjadi perbaikan struktur jaringan ginjal pada tikus yang diinduksi dengan sodium nitrit sehingga tampak seperti kelompok kontrol yang menandakan NSO memiliki efek menguntungkan terhadap inflamasi/ fibrosis dan stres oksidatif. Sama halnya dengan penelitian lain, penggunaan timokuinon yang merupakan salah satu kandungan habbatussauda dengan dosis 10 mg/kg atau setara 0,3 ml selama 18 hari dan pada hari ke-4 dilakukan obstruksi ureter unilateral menunjukkan secara jelas dapat menurunkan penanda fibrogenik dan sebagian melalui mekanisme penghambatan RAS, dan terjadi perbaikan fungsi ginjal yang terkait dengan perbaikan fibrosis ginjal juga dibandingkan dengan pemberian inhibitor RAS seperti losartan dan captopril (Hosseinian *et al.*, 2019).

Kombinasi madu dan habbatussauda sediaan minyak diketahui dapat meningkatkan hingga 3-4 kali antioksidan (Alkadri *et al.*, 2019). Dalam penelitian Noviana (2020) menyatakan bahwa kombinasi *Nigella sativa oil* dan madu dengan dosis masing-masing 2 ml/kg BB dan 7,4 ml/kg BB yang keduanya merupakan dosis besar memiliki efek sinergis yang sangat kuat terhadap kerusakan oksidasi pada ginjal tikus yang diinduksi dengan cisplatin dibandingkan dengan pemberian secara tunggal maupun kombinasi dengan dosis kecil. Hal tersebut ditandai dengan adanya penurunan malondialdehid (MDA) yang merupakan produk sekunder peroksidasi lipid dan sering digunakan sebagai biomarker stress oksidatif. NSO dan madu

yang dikombinasikan memiliki antioksidan dan konsentrasi fenol yang lebih tinggi dibandingkan pemberian secara tunggal (Noviana *et al.*, 2020). Penelitian lain diketahui belum ada pembahasan mengenai kombinasi tersebut terhadap persentase fraksi area fibrosis ginjal. Oleh karena itu, penelitian ini perlu dilakukan untuk mengetahui adanya pengaruh dari kombinasi madu dan habbatussauda terhadap persentase fraksi area fibrosis ginjal sebagai anti-fibrotik yang melibatkan aktivitas antioksidan dan anti-inflamasi.

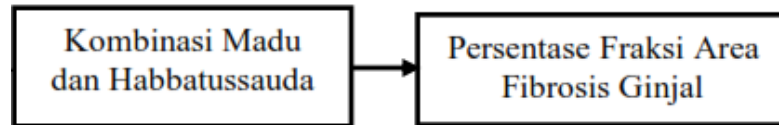


2.5. Kerangka Teori



Gambar 2.16. Kerangka Teori

2.6. Kerangka Konsep



Gambar 2.17. Kerangka Konsep

2.7. Hipotesis

Hipotesis dalam penelitian ini, yaitu kombinasi madu dan habbatussauda berpengaruh terhadap persentase fraksi area fibrosis ginjal pada tikus yang diinduksi obstruksi ureter unilateral.



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian jenis eksperimental yang menggunakan rancangan *post test only control group design*.

3.2. Variabel dan Definisi Operasional

3.2.1. Varibel Penelitian

3.2.1.1. Variabel Bebas

Dosis kombinasi madu dan habbatussauda

3.2.1.2. Variabel Terikat

Persentase fraksi area fibrosis ginjal

3.2.2. Definisi Operasional

3.2.2.1. Kombinasi Madu dan Habbatussauda

Kombinasi madu dan habbatussauda dalam penelitian ini adalah gabungan bahan alami dari larutan madu Pramuka jenis Multiflora dan minyak habbatussauda.

Larutan madu dibuat dengan cara melarutkan madu dalam air hangat sekitar 40°C, sedangkan minyak habbatussauda diperoleh dari produk jadi. Pemberian keduanya dilakukan terpisah dan diberikan secara oral menggunakan pipet 1 kali sehari selama 21 hari. Acuan dosis menggunakan metode *half dose* dan *double dose* sehingga terdapat 3 dosis

berbeda. Pemberian dosis madu, yaitu 0,675 ml/200gr/hari, 1,35 ml/200gr/hari, dan 2,7 ml/200gr/hari. Sedangkan, dosis habbatusauda diberikan sebanyak 0,1 ml/200gr/hari, 0,2 ml/200gr/hari, dan 0,4 ml/200gr/hari.

Skala data : Ordinal.

3.2.2.2. Persentase Fraksi Area Fibrosis Ginjal

Persentase fraksi area fibrosis ginjal merupakan penilaian fibrosis ginjal dengan *software* Image J 52 dan dinyatakan dalam persentase (%). Sebelumnya, preparat diberikan pewarnaan Sirius red dan diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x, serta difoto secara acak sebanyak 5 lapangan pandang dengan optilab. Preparat dalam mikroskop akan tampak warna kemerahan, sedangkan setelah dilakukan *software* Image J 52 tampak warna hitam yang menunjukkan adanya deposisi area kolagen.

Skala data : Rasio.

3.3. Subjek Uji

3.3.1. Populasi Penelitian

Penelitian ini menggunakan populasi tikus putih jantan galur Wistar model fibrosis ginjal dari Pusat Studi Pangan dan Gizi (PSPG) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta yang diberikan intervensi selama perawatan hewan coba.

3.3.2. Sampel Penelitian

3.3.2.1. Besar Sampel

Penelitian ini menggunakan dasar rumus Frederer untuk menentukan besar sampel dimana populasi terbagi dalam 5 kelompok sehingga didapatkan besar sampel sebagaimana berikut.

$$(n-1) \times (t-1) \geq 15$$

n = besar sampel per kelompok

t = Total kelompok diketahui 5 kelompok

$$(n-1) \times (5-1) \geq 15$$

$$(n-1) \times 4 \geq 15$$

$$n \geq (15 : 4) + 1$$

$$n \geq 3,75 + 1$$

$$n \geq 4,75 \text{ (dibulatkan)}$$

$$n = 5$$

Hasil perhitungan di atas didapatkan bahwa setiap kelompok penelitian memiliki besar sampel sebanyak 5 ekor tikus. Kemungkinan selama penelitian dapat terjadi *lost to follow up*, maka diperlukan penambahan 1 sampel tiap kelompok untuk menghindari hal tersebut sehingga tikus dipilih 6 ekor secara acak untuk setiap kelompok.

Jadi, total sampel secara keseluruhan sebesar 30 ekor tikus.

3.3.2.2. Cara Pengambilan Sampel

Sampel penelitian merupakan tikus yang harus memenuhi kriteria berikut.

a) Kriteria Inklusi :

1. Umur 2-3 bulan

2. Berat badan sekitar 180-220 gram
 3. Sehat baik secara fisik dan fisiologis, serta tidak ada kelainan baik di luar atau dalam tubuh
- b) Kriteria eksklusi : tidak ada
- c) *Drop out* : sakit atau mati selama penelitian.

3.4. Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1. Alat Penelitian

Alat-alat yang diperlukan dalam penelitian ini, yaitu :

1. Wadah makan dan minum tikus
2. Kandang tikus
3. Timbangan tikus
4. Sarung tangan
5. Pipet
6. Sduit 1 cc dan 5 cc
7. Gunting jaringan
8. Gunting lurus
9. Gunting bengkok
10. Pinset chirurgis
11. Pinset bengkok
12. *Micro cauter*
13. Jarum kulit
14. *Needle holder*
15. Benang jahit silk 3/0

16. Pita perekat
17. Botol steril
18. Tisu
19. Rak *staining* logam
20. *Humidity chamber*
21. *Glass jar*
22. *Deck glass*
23. *Object glass*
24. Label stiker
25. *Stopwatch*
26. Laptop
27. Mikroskop
28. OptiLab

3.4.2. Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini, yaitu :

1. Makanan dan minuman tikus
2. Natrium pentobarbital dalam air steril 0,1 ml/10grBB
3. Povidone iodine
4. Aquades
5. Madu dalam air hangat
6. Minyak Habbatussauda
7. Buffer formalin 10%
8. Etanol bertingkat

9. Xylene
10. PBS 1x1000 μ L
11. Sirius Red *working solution* 60-200 μ L
12. Cairan *canada balsam*

3.5. Cara Penelitian

3.5.1. Persiapan Sampel

1. Penyiapan 30 ekor tikus galur Wistar yang terpilih secara acak sesuai kriteria.
2. Tikus diadaptasikan terhadap kondisi laboratorium di PSPG UGM Yogyakarta selama 1 minggu sebelum penelitian.
3. Selama pemeliharaan dan penelitian, tikus mendapatkan tempat yang baik dan nyaman berupa kandang dengan ventilasi yang terkontrol, suhu 25 ± 2 ° C, dan kelembaban $55 \pm 5\%$, serta ada akses air dan makanan yang mudah diperoleh secara bebas.
4. Tikus dilakukan pemilihan secara acak pada 5 kelompok sehingga didapatkan 6 ekor tikus setiap kelompok.

3.5.2. Cara Menginduksi Fibrosis Ginjal

Obstruksi ureter unilateral merupakan metode yang digunakan dalam penelitian ini untuk memperoleh tikus model fibrosis ginjal dimana dilakukan di Pusat Studi Pangan dan Gizi (PSPG) UGM. Prinsip metode ini, yaitu meligasi 1 ureter dengan 1 kali ikatan. Fibrosis tubulointerstitial sering diinduksi dengan metode ini karena

diketahui memiliki kelebihan, diantaranya mengurangi kondisi uremik, tersedia kontrol berupa ginjal kontralateral, dan tidak timbul toksin eksogen (Arfian *et al.*, 2016). Obstruksi ureter unilateral selama 14 hari diketahui dapat menyebabkan adanya deposisi matriks ekstraseluler (Martínez-Klimova *et al.*, 2019). Dalam penelitian ini, metode tersebut dilakukan pada 4 kelompok selama 14 hari dengan cara-cara sebagaimana berikut.

- a. Persiapan untuk anestesi dengan menggunakan Natrium Pentobarbital yang sudah dilakukan 10 kali pengenceran (0,1 ml / 10 grBB) agar tikus diam dan tidak kesakitan saat pembedahan.
- b. Bulu tikus dilakukan pencukuran terlebih dahulu pada area perut terutama regio lumbalis pada salah satu sisi yang akan dilakukan ligasi.
- c. Lakukan tindakan antiseptik dengan memberikan povidone iodine pada kulit tikus.
- d. Bagian kulit dan fascia renalis regio lumbalis diinsisi kurang lebih 1,5 cm.
- e. Kemudian, identifikasi letak ginjal dan meraba polus posteroinferior sampai ureter.
- f. Ureter agak diangkat ke permukaan kulit. Selanjutnya, lakukan ligasi menggunakan benang jahit silk 3/0 pada 1 ureter dengan 1 ikatan yang tidak mudah lepas.

- g. Fascia renalis dan kulit dapat ditutup kembali dengan dilakukan penjahitan.
- h. Lakukan pemberian antiseptik pada bekas jahitan tersebut.
- i. Setelah efek anestesi hilang, maka tikus akan kembali sadar.

3.5.3. Persiapan Kombinasi Madu dan Habbatussauda

3.5.3.1. Persiapan Madu

Penelitian ini menggunakan air hangat 40°C sebagai pelarut Madu Pramuka jenis multiflora dengan volume berbeda-beda untuk setiap dosis madu, yaitu 2,725 ml air untuk 0,675 ml/200 gr/hari madu, 1,95 ml air untuk 1,35 ml/200 gr/hari madu, dan 0,4 ml air untuk 2,7 ml/200 gr/hari madu. Pemberian larutan madu ini secara oral dengan bantuan pipet karena memudahkan dalam mengatur volume sesuai keperluan.

3.5.3.2. Persiapan Minyak Habbatussauda (*Nigella sativa* L.)

Penelitian ini menggunakan produk jadi minyak habbatussauda yang diberikan secara oral dengan bantuan pipet.

3.5.3.3. Penentuan Dosis

a) Dosis Madu

Acuan dosis tengah madu yang digunakan dalam penelitian adalah 1,35 ml/tikus/hari selama 15 hari (Asfur & Sadewo, 2019). Berdasarkan metode

half dose dan *double dose*, maka diperoleh 3 dosis madu, yaitu 0,675 ml/200 gr/hari, 1,35 ml/200 gr/hari, dan 2,7 ml/200 gr/hari.

Dosis Habbatussauda

Acuan dosis tengah minyak habbatussauda yang digunakan dalam penelitian adalah 1 ml/kg BB atau sebanding dengan 0,2 ml/200 gr/hari (Alkadri, 2019). Berdasarkan metode *half dose* dan *double dose*, diperoleh 3 dosis habbatussauda, yaitu 0,5 ml/kg (0,1 ml/200 gr/hari), 1 ml/kg (0,2 ml/200 gr/hari), dan 2 ml/kg (0,4 ml/200 gr/hari).

b) Dosis Irbesartan

Dosis irbesartan diberikan sesuai acuan dosis, yaitu 13,5 mg/kg BB atau sebanding dengan 2,7 mg untuk 200 gram tikus (Harmely, 2018).

3.5.4. Pelaksanaan Penelitian

Penelitian eksperimental ini melakukan percobaan pada 30 ekor tikus jantan galur Wistar yang telah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi, serta dipilih 6 ekor tikus secara random untuk tiap kelompok yang jumlah totalnya ada 5 kelompok. Tikus tersebut diletakkan dalam kandang sesuai kelompok masing-masing dan dilakukan adaptasi terhadap kondisi laboratorium selama 1 minggu.

1) Kelompok kontrol ke-1 (KK1)

Kelompok ini sebagai kontrol negatif dimana dipelihara 6 ekor tikus dengan pemberian makan dan minum secara teratur, serta perlakuan berupa *Sham operation* yang tidak mendapatkan intervensi kombinasi madu dan habbatussauda.

2) Kelompok kontrol ke-2 (KK2)

Kelompok ini sebagai kontrol positif dimana dipelihara 6 ekor tikus dengan pemberian makan dan minum secara teratur, serta perlakuan metode UUO selama 14 hari dan diintervensi dengan 2,7 mg/200 gr/hari irbesartan selama 21 hari.

3) Kelompok perlakuan ke-1 (KP1)

Kelompok ini sebagai perlakuan dengan dosis kecil dimana dipelihara 6 ekor tikus dengan pemberian makan dan minum secara teratur, serta perlakuan metode UUO selama 14 hari dan diintervensi dengan kombinasi dosis 0,675 ml/200 gr/hari madu dan 0,5 ml/200 gr/hari habbatussauda selama 21 hari.

4) Kelompok perlakuan ke-2 (KP2)

Kelompok ini sebagai perlakuan dengan dosis tengah dimana dipelihara 6 ekor tikus dengan pemberian makan dan minum secara teratur, serta perlakuan metode UUO selama 14 hari dan diintervensi dengan kombinasi dosis 1,35 ml/200 gr/hari madu dan 1 ml/200 gr/hari habbatussauda selama 21 hari.

5) Kelompok perlakuan ke-3 (KP3)

Kelompok ini sebagai perlakuan dengan dosis tinggi dimana dipelihara 6 ekor tikus dengan pemberian makan dan minum secara teratur, serta perlakuan metode UUO selama 14 hari dan diintervensi dengan kombinasi dosis 2,7 ml/200 gr/hari madu dan 2 ml/200 gr/hari habbatussauda selama 21 hari.

3.5.5. Pengambilan Ginjal

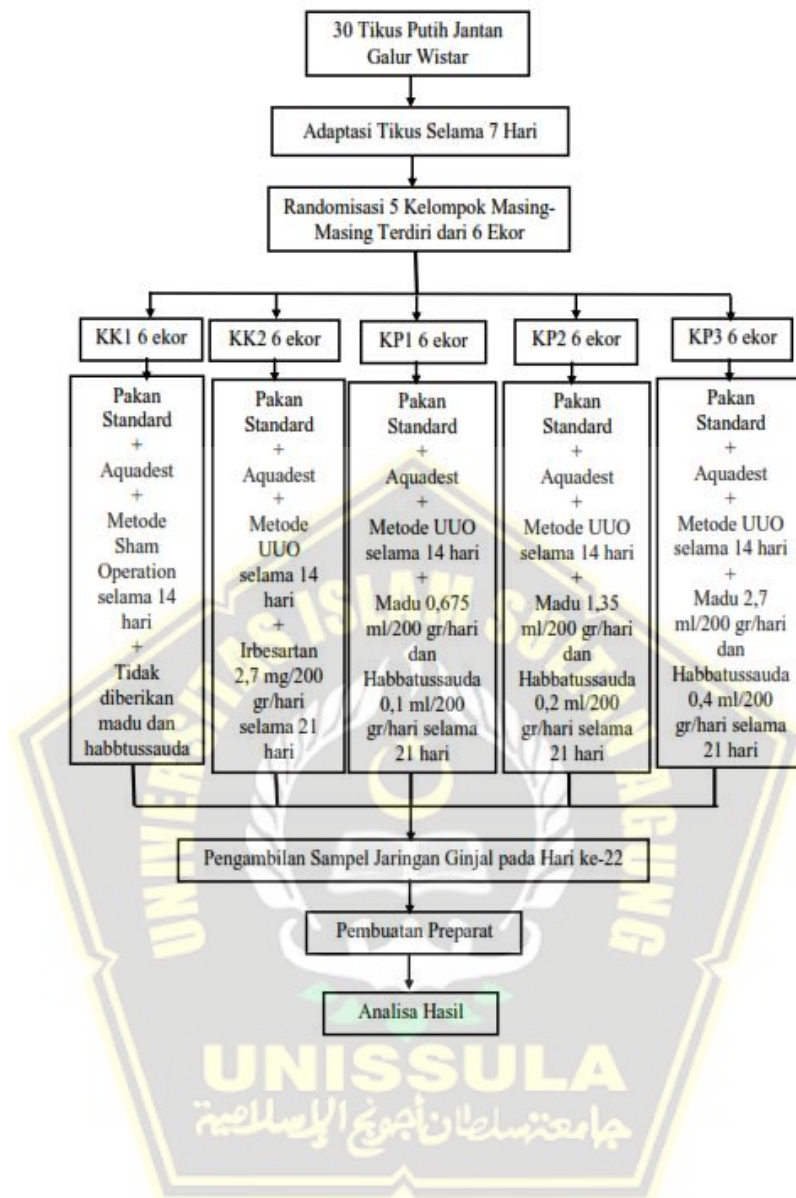
Pembiusan secara intraperitoneal dengan pentobarbital 60 mg/kg dilakukan terlebih dahulu untuk memudahkan pembedahan. Selanjutnya, dilakukan pembedahan dengan membuka bagian dada hingga perut tikus. Seluruh organ perut disingkirkan sehingga tampak ginjal yang diligasi dengan metode UUO. Pengambilan ginjal dilakukan secara hati-hati sehingga tidak merusak jaringan ginjal. Organ ginjal difiksasi dengan buffer formalin 10% supaya organ tidak mengalami kerusakan dan disimpan dalam wadah yang tertutup rapat selama 48 jam. Pengangkutan organ ginjal dilakukan dari UGM ke bagian Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Islam Sultan Agung.

3.5.6. Pembuatan dan Pembacaan Preparat Histopatologi

Organ ginjal dipotong secara membujur dengan ketebalan sekitar 0,5 mm dan difiksasi lagi selama 24 jam. Jaringan direndam dalam etanol, xylol, dan cairan paraffin sehingga jaringan terbenam

dalam blok paraffin. Blok dipotong 4 mikrometer dengan mikrotom dan diletakan di *object glass*. Slide tersebut dilakukan deparafinisasi dan direhidrasi dengan etanol bertingkat. Kemudian, slide dicuci dengan PBS 1x1000 μ L selama 5 menit sebanyak 3 kali dan ditetaskan Sirius Red *working solution* sebanyak 60-200 μ L pada setiap slide selama 1 jam di suhu ruangan (20-22°C). Selanjutnya, slide direndam lagi dengan etanol 100% dan xylene. Setiap pemberian larutan dilakukan pengeringan dengan tisu pada permukaan bawah dan sekitar jaringan tanpa menyentuh jaringan. Terakhir, *mounting* dengan ditetaskan cairan *canada balsem (Entellan)* dan ditutup *deck glass*. Preparat diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x, serta difoto secara acak sebanyak 5 lapangan pandang dengan optilab. Pada mikroskop akan tampak warna kemerahan yang menunjukkan deposisi area kolagen. Kemudian, foto tersebut dianalisis dengan *software Image J 52* sehingga foto tersebut menjadi berwarna hitam dan dinyatakan dalam persentase yang merupakan persentase fraksi area fibrosis ginjal.

3.6. Alur Penelitian



Gambar 3.1. Alur Penelitian

3.7. Tempat dan Waktu Penelitian

3.7.1. Tempat Penelitian

Pemeliharaan dan penelitian terhadap hewan uji coba dilakukan di Pusat Studi Pangan dan Gizi (PSPG) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

3.7.2. Waktu Penelitian

Pelaksanaan penelitian ini dimulai dari bulan Juni sampai Agustus 2021.

3.8. Analisis Hasil

Hasil persentase fraksi area fibrosis ginjal dari *software* Image J 52 merupakan data skala rasio yang dianalisis dengan program SPSS IBM versi 23. Data diuji dengan *Shapiro-Wilk* dan *Levene's test* untuk menentukan normalitas dan homogenitas data. Data yang normal dan homogen masing-masing dinyatakan dengan nilai $p > 0,05$. Data yang tidak normal dan tidak homogen dapat ditransformasi terlebih dahulu. Setelah transformasi didapatkan data masih tidak normal dan tidak homogen, maka dilakukan uji beda dengan menggunakan uji non-parametrik berupa uji *Kruskall wallis* untuk mengetahui adanya perbedaan yang signifikan. Pasangan kelompok-kelompok tersebut yang diketahui terdapat perbedaan yang bermakna dapat dianalisis secara manual dengan uji *Mann Whitney U*.

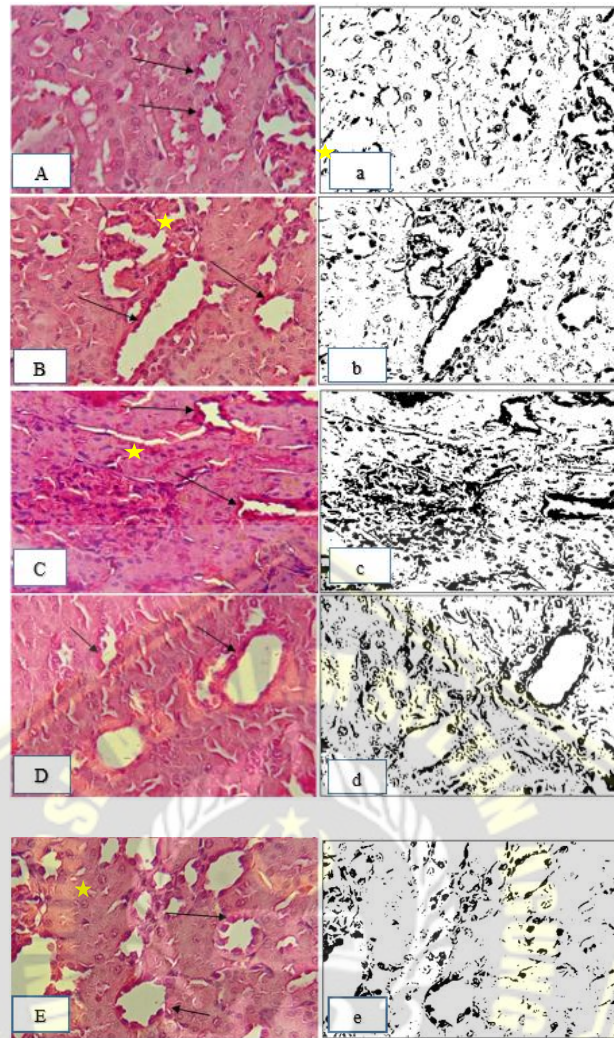
BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Penelitian

Hasil penelitian tentang pengaruh kombinasi madu dan habbatussauda terhadap persentase fraksi area fibrosis ginjal yang telah dilakukan di PSPG UGM Yogyakarta dan Laboratorium PA RSISA Semarang pada bulan Juni - Agustus 2021. Sampel dalam penelitian ini berjumlah 30 ekor tikus galur Wistar yang dibagi dalam 5 kelompok dimana tiap kelompok terdapat 6 ekor yang terpilih secara acak. Selama penelitian tidak terdapat tikus yang sakit atau mati sehingga dapat berjalan lancar sesuai alur penelitian. Sebelumnya dalam uji pendahuluan diketahui ginjal tikus yang diinduksi obstruksi ureter unilateral dapat menyebabkan persentase fraksi area fibrosis ginjal cukup tinggi, yaitu 53 %.

Hasil pengamatan gambaran histopatologi ginjal ditunjukkan dalam gambar 4.1.



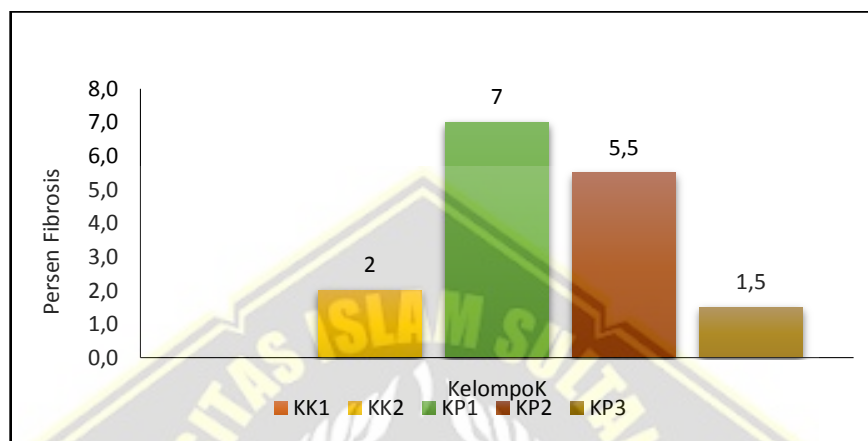
Gambar 4.1. Gambaran Histopatologi Ginjal Tikus Pewarnaan Sirius red dengan Perbesaran 400x

Keterangan :

Hasil pengamatan preparat dengan mikroskop (huruf besar) dan hasil dari *Software Image J* (huruf kecil). A dan a : KK1, B dan b : KK2, C dan c : KP1, D dan d : KP2, E dan e : KP3. Tanda panah menunjukkan area tubulointerstitial dan warna kemerahan menandakan adanya deposisi kolagen (fibrosis). Tanda bintang menunjukkan glomerulus.

Gambaran dari mikroskop tersebut menunjukkan area fibrosis yang ditandai adanya deposisi kolagen yang berwarna kemerahan di sekitar tubulus renalis yang berepitel kuboid simpleks. Selain itu, ada juga gambaran glomerulus yang dilapisi kapsul parietal berepitel skuamosa dan

terdapat struktur sawar filtrasi berupa endotel kapiler berfenestra yang terisi oleh sel darah merah. Pada hari ke-22, hasil gambaran mikroskop diinterpretasikan dalam *software* Image J 52 dan didapatkan persentase fraksi area fibrosis yang diperhitungkan mediannya dalam bentuk persen sebagaimana berikut.



Gambar 4.2. Median Persentase Fraksi Area Fibrosis Ginjal Setiap Kelompok

Berdasarkan grafik tersebut diketahui bahwa median persentase fibrosis tertinggi (7%) ditunjukkan pada kelompok KP1, kemudian diikuti pada kelompok KP2 (5,5%). Kelompok KP3 (1,5%) yang lebih rendah dan hampir mendekati KK2 (2%). Sedangkan, fibrosis terendah (0%) ditunjukkan pada KK1. Selanjutnya, analisis statistik diperlukan untuk membuktikan kebermaknaannya perbedaan persentase fraksi area fibrosis ginjal tersebut. Analisis tersebut meliputi uji normalitas dan homogenitas, serta analisis perbedaan.

Tabel 4.1. Hasil Uji Deskriptif Statistik, Normalitas Sebaran Data, Homogenitas Varian, dan Uji Beda *Kruskal wallis*

Kelompok	Median (min – maks)	<i>p-value</i>		
		<i>Shapiro Wilk</i>	<i>Levene test</i>	<i>Kruskal wallis</i>
KK1	0 (0 – 0)	0,000	0,037	0,000**
KK2	2 (1 – 2)	0,000		
KP1	7 (7 – 8)	0,000		
KP2	5,5 (3 – 7)	0,554*		
KP3	1,5 (1 – 2)	0,004		

Keterangan: * = distribusi normal; ** = perbedaan bermakna

Uji *Shapiro Wilk* dan *Lavene's test* masing-masing untuk menganalisis normalitas dan homogenitas data penelitian. Berdasarkan tabel di atas diketahui sebaran data persentase fibrosis yang normal hanya ditunjukkan oleh kelompok KP2 ($p > 0,05$), dan kelima kelompok juga memiliki varian persentase fibrosis tidak homogen ($p = 0,037$). Oleh karena distribusi data sebagian besar kelompok tidak normal dan variannya juga tidak homogen, maka perbedaan persentase fibrosis pada kelima kelompok dianalisis dengan *Kruskal Wallis* dan diperoleh nilai $p < 0,05$, yaitu 0,000 artinya data kelompok berbeda secara signifikan. Selanjutnya, analisis *Mann Whitney* untuk mengetahui kelompok mana yang persentase fibrosisnya berbeda secara bermakna, dengan hasil dalam tabel 4.2 berikut.

Tabel 4.2. Hasil Uji *Mann Whitney* Perbedaan Persentase Fibrosis Antar Dua Kelompok

Kelompok	KK1	KK2	KP1	KP2	KP3
KK1	-	0,001*	0,001*	0,002*	0,002*
KK2		-	0,002*	0,003*	0,241
KP1			-	0,008*	0,002*
KP2				-	0,003*
KP3					-

Keterangan: * = perbedaan bermakna

Berdasarkan hasil uji *Mann Whitney* diketahui bahwa pasangan setiap kelompok menunjukkan perbedaan persentase fibrosis yang signifikan ($p < 0,05$) kecuali pasangan kelompok KK2 dan KP3 yang tidak ada kebermaknaan dengan nilai $p = 0,241$. Hal tersebut artinya perlakuan pada KK2 dan KP3 memiliki pengaruh yang serupa terhadap persentase fraksi area fibrosis ginjal.

4.2. Pembahasan Hasil

Fibrosis ginjal merupakan gambaran akhir dari penyakit gagal ginjal kronik yang dapat dibagi menjadi 2 jenis, yaitu fibrosis tubulointerstitial dan glomerulosklerosis (Cho, 2010). Obstruksi ureter unilateral dapat menyebabkan fibrosis ginjal yang ditandai adanya akumulasi kolagen di ginjal yang terobstruksi. Ligasi ureter akan menyebabkan peningkatan tekanan intratubular sehingga sel tubulus teregang dan merangsang pengaktifan sistem RAS yang akan mengaktifasi faktor profibrotik terutama mengekspresikan TGF- β 1 yang dihasilkan oleh makrofag (Hosseinian *et al.*, 2019). Faktor tersebut memicu proliferasi fibroblas dan terhambatnya matriks metalloproteinase, serta mengaktifkan miofibroblas sehingga terbentuknya akumulasi kolagen (Hosseinian *et al.*, 2019). Selain itu, jumlah tubulus akan berkurang dan mengalami atrofi, dilatasi, dan membentuk kistik dengan epitel tipis, serta terjadi apoptosis pada sel epitel tubulus akibat stimulus TGF- β 1 dan TNF- α (Martínez-Klimova *et al.*, 2019). Tubulus kontortus distal yang berdilatasi menyebabkan pertambahan jarak antara glomerulus dimana glomerulus juga mengalami atrofi dan sel-selnya

mengalami penyusutan sama halnya dengan kapsul Bowman. Tubulus kolektivus di medulla ginjal juga mengalami atrofi dengan lumen pada bagian distal menyempit dan bagian proksimalnya melebar. Pada jaringan interstitial ginjal yang meradang dapat ditemukan adanya sel-sel neutrofil (Arifianto *et al.*, 2020). Hal tersebut merupakan perubahan secara mikroskopis. Sedangkan, ginjal secara makroskopis lebih bengkak dan kemerahan setelah dilakukan obstruksi ureter unilateral (Tingskov *et al.*, 2021).

Hasil penelitian ini didapatkan bahwa kombinasi madu dan habbatussauda pada variasi dosis dapat menurunkan persentase fraksi area fibrosis ginjal yang mendekati presentase kelompok kontrol ke-1 (KK1) dan kelompok kontrol ke-2 (KK2). Urutan kombinasi dari paling baik efeknya, yaitu kelompok perlakuan ke-3 (KP3), kelompok perlakuan ke-2 (KP2), dan kelompok perlakuan ke-1 (KP1). Hal ini dikarenakan kandungan madu dan habbatussauda yang berperan sebagai antioksidan dimana kandungan senyawa flavonoid dan senyawa fenolik pada madu dan komponen timokuinon dan flavonoid pada habbatussauda (Noviana *et al.*, 2020). Kombinasi tersebut diketahui dapat meningkatkan 3-4 kali efek antioksidan (Alkadri *et al.*, 2019). Berdasarkan uji pendahuluan diketahui bahwa ginjal yang diinduksi obstruksi ureter unilateral tanpa pemberian kombinasi didapatkan persentase fibrosis yang cukup tinggi sekitar 53%. Persentase fraksi area fibrosis ginjal diinterpretasi dengan *software Image J 52* sehingga untuk mencegah terjadinya hasil yang bias, maka operator *software* tersebut

dilakukan oleh orang yang sama. Pada penelitian ini, pemberian kombinasi dengan dosis tinggi lebih baik dan mendekati kelompok kontrol dibandingkan dosis kombinasi lainnya. Penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian-penelitian sebelumnya yang menggunakan penginduksi lain.

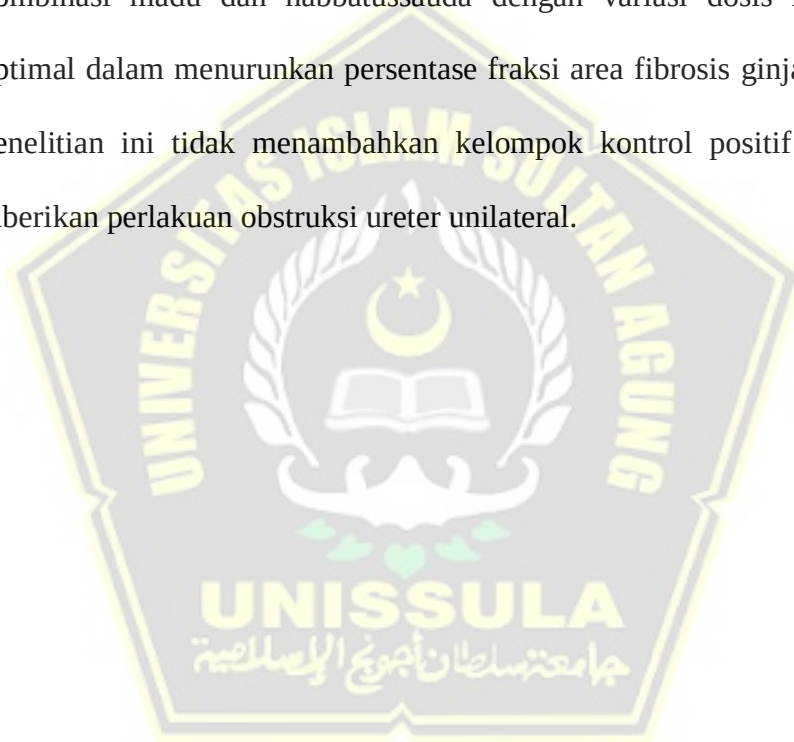
Penelitian Noviana (2020) menggunakan cisplatin yang bersifat nefrotoksisitas dan dapat merusak sel melalui jalur stress oksidatif. Pemberian kombinasi dosis tinggi madu dan minyak habbatussauda diketahui ada efek sinergis yang sangat kuat bila dibandingkan pemberian secara tunggal atau kombinasi dosis lainnya. Madu melalui penghambatan aktivasi *nuclear factor-kappa B* (NF- κ B) dapat menurunkan inflamasi dan stress oksidatif. Sedangkan, habbatussauda sediaan minyak melibatkan mekanisme penghambatan pembentukan radikal bebas dengan meningkatkan antioksidan endogen dan enzim antioksidan, serta meregenerasi membran PUFA yang dirusak oleh ROS (Noviana *et al.*, 2020). Pada penelitian tersebut dibuktikan adanya penurunan MDA yang berperan sebagai penghambat aktivitas tissue-inhibitory matrix metalloproteinase (TIMP) dan memicu matrix metalloproteinase (MMP) sehingga terjadi peningkatan produksi matriks dan kolagen (Noviana *et al.*, 2020). Stres oksidatif dapat menyebabkan fibrosis ginjal yang melibatkan TGF- β 1. Selain itu, inflamasi dapat memicu pembentukan fibrosis yang melibatkan TNF- α akibat stres oksidatif sehingga madu dan habbatussauda dapat dijadikan sebagai anti-inflamasi dan antifibrotik (Rehman & Majid, 2020). Metode obstruksi ureter unilateral menginisiasi peningkatan TGF- β 1

yang berperan sebagai faktor profibrotik melalui jalur fosforilasi (Rehman & Majid, 2020). Dalam penelitian sebelumnya, pemberian tunggal madu atau habbatussauda diketahui dapat menurunkan ekspresi TGF- β 1 sehingga dapat mengurangi fibrosis interstitial melalui jalur anti-fibrotik (Hosseinian, 2019; Ibrahim, 2016).

KP3 memiliki efek kombinasi paling baik dan hampir sama dengan KK2 yang menggunakan irbesartan sebagai pembanding. Namun, persentase KP3 lebih mendekati persentase dari KK1 yang diberikan *sham operation*, yaitu operasi palsu seperti obstruksi ureter unilateral tetapi tanpa dilakukan ligasi ureter ginjal (Atkinson *et al.*, 2021). Madu dan habbatussauda sebagai antioksidan dapat menurunkan radikal bebas yang dapat berperan baik sebagai anti-fibrotik ataupun anti-hipertensi. Seiring dengan itu, terjadi peningkatan *nitric oxide* (NO) yang menyebabkan vasodilatasi dan penurunan tahanan perifer total sehingga terjadi penurunan tekanan darah yang semula meningkat akibat stress oksidatif (Leong *et al.*, 2013; Erejuwa *et al.*, 2012). Adanya ROS yang tinggi menyebabkan stress oksidatif yang dapat merusak membran lipid sel dan menghasilkan produk akhir berupa MDA yang sering digunakan sebagai biomarker stress oksidatif (Leong *et al.*, 2013). Penelitian ini pada KK2 menggunakan irbesartan sebagai kontrol positif karena melibatkan mekanisme yang serupa melalui efek agonis dan antagonis. Efek agonisnya sebagai antifibrotik pada ginjal melalui penurunan TGF- β 1 dan sitokin proinflamasi, serta profibrotik melalui aktivasi PPAR γ -HGF yang ditunjukkan adanya infiltrasi makrofag yang

menurun pada ginjal dan penurunan area miofibroblas. Sedangkan, efek antagonisnya terhadap reseptor angiotensin II tipe 1 sebagai anti-hipertensi dimana angiotensin II diketahui dapat menginduksi stress oksidatif (Kusunoki *et al.*, 2013). Pada penelitian ini, pengaruh dosis tinggi kombinasi madu dan habbatussauda memiliki efek yang sama dengan efek irbesartan sebagai antifibrotik.

Keterbatasan dalam penelitian ini, yaitu tidak menyertakan kelompok kombinasi madu dan habbatussauda dengan variasi dosis minimal dan optimal dalam menurunkan persentase fraksi area fibrosis ginjal. Selain itu, penelitian ini tidak menambahkan kelompok kontrol positif yang hanya diberikan perlakuan obstruksi ureter unilateral.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

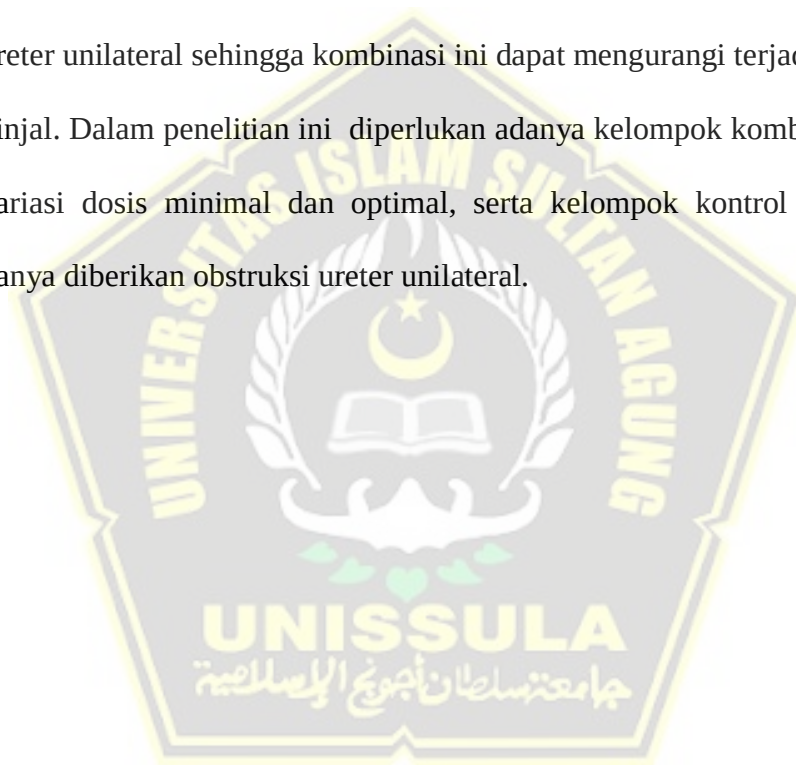
Kesimpulan yang dapat diperoleh berdasarkan hasil analisis data penelitian tersebut adalah :

- 5.1.1. Kombinasi madu dan habbatussauda berpengaruh terhadap persentase fraksi area fibrosis ginjal yang diinduksi obstruksi ureter unilateral.
- 5.1.2. Persentase fraksi area fibrosis ginjal pada kelompok dosis kombinasi 0,675 ml/200 gr/hari madu dan 0,5 ml/200 gr/hari habbatussauda, dosis kombinasi 1,35 ml/200 gr/hari madu dan 1 ml/200 gr/hari habbatussauda, serta dosis kombinasi 2,7 ml/200 gr/hari madu dan 2 ml/200 gr/hari habbatussauda masing-masing sebesar 7%, 5,5%, dan 1,5%.
- 5.1.3. Persentase fraksi area fibrosis ginjal pada masing-masing kelompok kontrol, diantaranya 0% pada kelompok kontrol negatif dan 2% pada kelompok kontrol positif dimana semakin kecil persentase fraksi area fibrosis, maka semakin baik efek perlakuannya karena berkurangnya fibrosis.
- 5.1.4. Pengaruh dosis kombinasi madu dan habbatussauda berbeda secara signifikan terhadap penurunan persentase fraksi area fibrosis ginjal yang diinduksi obstruksi ureter unilateral pada seluruh kelompok variasi dosis kombinasi terhadap semua kelompok kontrol, **kecuali**

kelompok perlakuan ke-3 yang tidak signifikan dengan kelompok kontrol positif.

5.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini, didapatkan bahwa dosis kelompok perlakuan ke-3 dengan pemberian dosis kombinasi 2,7 ml/200 gr/hari madu dan 0,4 ml/200 gr/hari habbatussauda memiliki pengaruh terbaik dalam menurunkan persentase fraksi area fibrosis ginjal setelah diinduksi obstruksi ureter unilateral sehingga kombinasi ini dapat mengurangi terjadinya fibrosis ginjal. Dalam penelitian ini diperlukan adanya kelompok kombinasi dengan variasi dosis minimal dan optimal, serta kelompok kontrol positif yang hanya diberikan obstruksi ureter unilateral.



DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, A., Husain, A., Mujeeb, M., Khan, S. A., Najmi, A. K., Siddique, N. A., Damanhour, Z. A., & Anwar, F. (2013). A Review on Therapeutic Potential of *Nigella sativa*: A Miracle Herb. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(5), 337–352. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60075-1](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60075-1)
- Al-Gayyar, M. M. H., Hassan, H. M., Alyoussef, A., Abbas, A., Darweish, M. M., & El-Hawwary, A. A. (2016). *Nigella Sativa* Oil Attenuates Chronic Nephrotoxicity Induced by Oral Sodium Nitrite: Effects on Tissue Fibrosis and Apoptosis. *Redox Report*, 21(2), 50–60. <https://doi.org/10.1179/1351000215Y.0000000035>
- Ali, B. H., & Blunden, G. (2003). Pharmacological and Toxicological Properties of *Nigella sativa*. *PHYTOTHERAPY RESEARCH*, 299–305. <https://doi.org/10.1002/ptr.1309>
- Alkadri, S. L. F., Ilmiawan, M. I., & Handini, M. (2019). Efek Protektif Kombinasi Minyak Jintan Hitam dan Madu terhadap Hepatotoksisitas pada Tikus Akibat Sisplatin. *EJournal Kedokteran Indonesia*, 7(2). <https://doi.org/10.23886/ejki.7.10740>
- Alsuhaibani, A. M. A. (2018a). Effect of *nigella sativa* against cisplatin induced nephrotoxicity in rats. *Italian Journal of Food Safety*. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2018.7242>
- Alsuhaibani, A. M. A. (2018b). Effect of *Nigella Sativa* Against Cisplatin Induced Nephrotoxicity in Rats. *Italian Journal of Food Safety*, 7(2), 105–109. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2018.7242>
- Alvarez-Suarez, J. M. (2017). Bee Products - Chemical and Biological Properties. In J. A. S. Hana Scepankova & L. M. Estevinho (Eds.), *Bee Products - Chemical and Biological Properties* (pp. 83–96). Springer. https://doi.org/DOI 10.1007/978-3-319-59689-1_4
- Andriani, M., Utami, R., Hariyati, L. F., Teknologi, J., Pertanian, H., & Pertanian, F. (2012). AKTIVITAS ANTIBAKTERI BERBAGAI JENIS MADU TERHADAP BAKTERI PEMBUSUK (*Pseudomonas fluorescens* FNCC 0071 dan *Pseudomonas putida* FNCC 0070) ANTIBACTERIA ACTIVITY OF SOME HONEYS TO FOOD SPOILAGE BACTERIA (*Pseudomonas fluorescens* FNCC 0071 dan *Pseudomonas puti*. *Biomedika*, 5(1). [https://eprints.uns.ac.id/13215/1/Publikasi_Jurnal_\(7\).pdf](https://eprints.uns.ac.id/13215/1/Publikasi_Jurnal_(7).pdf)

- Arfian, N., Muflikhah, K., Soeyono, S. K., Sari, D. C. R., Tranggono, U., Anggorowati, N., & Romi, M. M. (2016). Vitamin D Attenuates Kidney Fibrosis via Reducing Fibroblast Expansion, Inflammation, and Epithelial Cell Apoptosis. *Kobe Journal of Medical Sciences*, 62(2), E38–E44.
- Arifianto, D., Adji, D., Sutrisno, B., & Rickiawan, N. (2020). Renal Histopathology , Blood Urea Nitrogen and Creatinine Levels of Rats With Unilateral Ureteral Obstruction. *Indonesian Journal of Veterinary Sciences*, 1(1), 1–9. <https://doi.org/10.22146/ijvs.v1i1.46515>
- Asfur, R., & Sadewo, G. (2019). Pengaruh Pemberian Madu terhadap Fungsi Ginjal (Ureum dan Kreatinin) Tikus Putih (*Rattus norvegicus* L.) Jantan Galur Wistar yang Diinduksi Tuak. *Jurnal Ilmiah Kohesi*, 3(2), 88–92.
- Atkinson, J., Boden, T., Mocho, J. P., & Johnson, T. (2021). Refining The Unilateral Ureteral Obstruction Mouse Model: No Sham, No Shame. *Laboratory Animals*, 55(1), 21–29. <https://doi.org/10.1177/0023677220909401>
- Benkaci-Ali, F., Baaliouamer, A., Meklati, B. Y., & Chemat, F. (2007). Chemical composition of seed essential oils from Algerian *Nigella sativa* extracted by microwave and hydrodistillation. *Flavour and Fragrance Journal*. <https://doi.org/10.1002/ffj.1773>
- Chevalier, R. L., Forbes, M. S., & Thornhill, B. A. (2009). Ureteral Obstruction as A Model of Renal Interstitial Fibrosis and Obstructive Nephropathy. *Kidney International*, 75(11), 1145–1152. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.86>
- Cho, M. H. (2010). Renal fibrosis. *Korean Journal of Pediatrics*, 53(7), 735–740. <https://doi.org/10.3345/kjp.2010.53.7.735>
- Cianciosi, D., Forbes-Hernández, T. Y., Afrin, S., Gasparrini, M., Reboredo-Rodriguez, P., Manna, P. P., Zhang, J., Lamas, L. B., Flórez, S. M., Toyos, P. A., Quiles, J. L., Giampieri, F., & Battino, M. (2018). Phenolic compounds in honey and their associated health benefits: A review. *Molecules*, 23(9), 1–20. <https://doi.org/10.3390/molecules23092322>
- Crane, E., & Visscher, P. K. (2009). *Encyclopedia of Insects* (V. H. Resh & R. T. Cardé (eds.); 2nd ed.). Elsevier.
- Datta, A. K., Saha, A., Bhattacharya, A., Mandal, A., Paul, R., & Sengupta, S. (2012). Black cumin (*Nigella sativa* L.) – a review. *Journal of Plant Development Sciences*, 4(1), 1–43.

- Drake, R. L., Vogl, W., & Mitchell, A. W. M. (2012). *Gray's Basic Anatomy* (C. C. Lewis, M. D. Lazarus, B. M. Jones, J. M. McBride, & M. H. Hankin (eds.)). Elsevier Churchill Livingstone.
- Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. A., Ab Wahab, M. S., Sirajudeen, K. N. S., Salleh, S., & Gurtu, S. (2012). Honey Supplementation in Spontaneously Hypertensive Rats Elicits Antihypertensive Effect via Amelioration of Renal Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 14. <https://doi.org/10.1155/2012/374037>
- Evahelda, E., Pratama, F., & Santoso, B. (2017). Sifat Fisik dan Kimia Madu dari Nektar Pohon Karet di Kabupaten Bangka Tengah, Indonesia. *Agritech*, 37(4), 363–368. <https://doi.org/10.22146/agritech.16424>
- Fischer, C., Deininger, N., Wolf, G., & Loeffler, I. (2018). CERA Attenuates Kidney Fibrogenesis in the db/db Mouse by Influencing the Renal Myofibroblast Generation. *Journal of Clinical Medicine*, 7(2), 15. <https://doi.org/10.3390/jcm7020015>
- Harmely, F., Nasrul, E., Umar, S., Zaini, E., & Aldi, Y. (2018). Pengaruh Dispersi Padat Irbesartan-Poloxamer 188 Terhadap Tekanan Darah dan Kadar Nitric Oxide (NO) Pada Tikus Putih Jantan Hipertensi. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, 5(2), 88. <https://doi.org/10.25077/jsfk.5.2.88-93.2018>
- Hatta, I., Pratami, K. A., & Apriasari, M. L. (2019). Analysis of Oral Chronic Kidney Disease with Hemodialysis Therapy in South Kalimantan - Indonesia. *Berkala Kedokteran*, 15(2), 77–88. <https://doi.org/10.20527/jbk.v15i2.7129>
- Hong, W., Zhang, G., Lu, H., Guo, Y., Zheng, S., Zhu, H., Xiao, Y., Papa, A. P. D., Wu, C., Sun, L., Chen, B., & Bai, Y. (2019). Epithelial and interstitial Notch1 activity contributes to the myofibroblastic phenotype and fibrosis. *Cell Communication and Signaling*, 17(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0455-y>
- Hosseinian, S., Shahraki, S., Ebrahimzadeh Bideskan, A., Shafei, M. N., Sadeghnia, H. R., Soukhtanloo, M., Rahmani, F., & Khajavi Rad, A. (2019). Thymoquinone Alleviates Renal Interstitial Fibrosis and Kidney Dysfunction in Rats with Unilateral Ureteral Obstruction. *Phytotherapy Research*, 33(8), 2023–2033. <https://doi.org/10.1002/ptr.6376>
- Hudri, F. A. (2014). *Uji Efektivitas Ekstrak Madu Multiflora dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri Salmonella typhi*. 1–65.
- Ibrahim, A., Eldaim, M. A. A., & Abdel-Daim, M. M. (2016a). Nephroprotective effect of bee honey and royal jelly against subchronic cisplatin toxicity in rats. *Cytotechnology*, 68(4), 1039–1048.

<https://doi.org/10.1007/s10616-015-9860-2>

- Ibrahim, A., Eldaim, M. A. A., & Abdel-Daim, M. M. (2016b). Nephroprotective effect of bee honey and royal jelly against subchronic cisplatin toxicity in rats. *Cytotechnology*, 68(4), 1039–1048. <https://doi.org/10.1007/s10616-015-9860-2>
- Kang, M. K., Park, S. H., Choi, Y. J., Shin, D., & Kang, Y. H. (2015). Chrysin inhibits diabetic renal tubulointerstitial fibrosis through blocking epithelial to mesenchymal transition. *Journal of Molecular Medicine*, 93(7), 759–772. <https://doi.org/10.1007/s00109-015-1301-3>
- Kemenkes RI. (2017). InfoDATIN Ginjal. *Situasi Penyakit Ginjal Kronik*, 1–10.
- KÖKDİL, G., İLÇİM, A., ÖZBİLGİN, B., & UYGUN, C. (2006). Morphology and Stem Anatomy of Some Species of Genus *Nigella* L. in Turkey. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 35(1), 19–41. https://doi.org/10.1501/Eczfak_00000000049
- Kooti, W., Hasanzadeh-Noohi, Z., Sharafi-Ahvazi, N., Asadi-Samani, M., & Ashtary-Larky, D. (2016). Phytochemistry, Pharmacology, and Therapeutic Uses of Black Seed (*Nigella sativa*). *Chinese Journal of Natural Medicines*, 14(10), 732–745. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(16\)30088-7](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(16)30088-7)
- Kumar, V., Abbas, A. K., & Aster, J. C. (2015). The Kidney. In C. E. Alpers & A. Chang (Eds.), *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease* (9th ed., p. 925). Elsevier Saunders.
- Kusunoki, H., Taniyama, Y., Rakugi, H., & Morishita, R. (2013). Cardiac and Renal Protective Effects of Irbesartan via Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Hepatocyte Growth Factor Pathway Independent Of Angiotensin II Type 1a Receptor Blockade in Mouse Model of Salt-Sensitive Hypertension. *Journal of the American Heart Association*, 2(2), 1–12. <https://doi.org/10.1161/JAHA.113.000103>
- Lebleu, V. S., Taduri, G., Teng, Y., Vesselina, G., Woda, C., Sugimoto, H., Kalluri, R., Israel, B., & Medical, D. (2014). *HHS Public Access*. 19(8), 1047–1053. <https://doi.org/10.1038/nm.3218.Origin>
- Leong, X. F., Rais Mustafa, M., & Jaarin, K. (2013). *Nigella sativa* and Its Protective Role in Oxidative Stress and Hypertension. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 9. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1155/2013/120732>
- Lin, Y. C., Chang, Y. H., Yang, S. Y., Wu, K. D., & Chu, T. S. (2018). Update of Pathophysiology and Management of Diabetic Kidney Disease. *Journal*

- of the Formosan Medical Association, 117(8), 662–675.
<https://doi.org/10.1016/j.jfma.2018.02.007>
- Majtan, J. (2014). Honey: An Immunomodulator in Wound Healing. *Wound Repair and Regeneration*, 22(2), 187–192.
<https://doi.org/10.1111/wrr.12117>
- Martínez-Klimova, E., Aparicio-Trejo, O. E., Tapia, E., & Pedraza-Chaverri, J. (2019). Unilateral Ureteral Obstruction as a Model to Investigate Fibrosis-Attenuating Treatments. *Biomolecules*, 9(4).
<https://doi.org/10.3390/biom9040141>
- Mescher, A. L., & Junqueira, L. C. U. (2013). Urinary System. In *Junqueira's Basic Histology* (13th ed., Issue 1, p. 511). McGraw-Hill Education; McGraw-Hill Medical. <https://doi.org/10.1186/s13662-018-1725-5>
- Moore, K. L., II, A. F. D., & Agur, A. M. R. (2014). Abdomen. In *MOORE Clinically Oriented Anatomy* (7th ed., p. 1170). Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins. https://doi.org/10.1007/978-3-540-35113-9_5
- Morgado, E., & Leo, P. (2012). Hypertension and Chronic Kidney Disease: Cause and Consequence – Therapeutic Considerations. *Antihypertensive Drugs*. <https://doi.org/10.5772/36916>
- Nadhilla, N. F. (2014). THE ACTIVITY OF ANTIBACTERIAL AGENT OF HONEY AGAINST *Staphylococcus aureus*. *J Majority*, 3(7), 94–101.
- Nadkarni, K. M. N. A. K. (1976). *Indian Materia Medica: with Ayurvedic, Unani-Tibbi, Siddha, Allopathic, Homeopathic, Naturopathic & Home Remedies, Appendices & Indexes* (3rd ed.). Popular Prakashan Private Ltd.
- Noviana, R., In, M., & Handini, M. (2020). Synergistic Protective Effect of Commercial *Nigella Sativa* Oil and Honey Combination against Cisplatin-induced Nephrotoxicity in Rats. *Jurnal Biotek Medisiana Indonesia*, 9(1), 57–66.
- Paarakh, P. M. (2010). *Nigella sativa* Linn.- A comprehensive review. In *Indian Journal of Natural Products and Resources*.
- Patel, V. B., & Preedy, V. R. (2016). Assessing Fibrosis in Kidney Biopsies. In B. G. Nezami & A. B. Farris (Eds.), *Biomarkers in Kidney Disease* (pp. 933–949). Springer Netherlands. https://doi.org/DOI 10.1007/978-94-007-7699-9_51

- Ping, N. C., Hashim, N. H., & Hasan Adli, D. S. (2014). Effects of *Nigella sativa* (Habbatus sauda) Oil and Nicotine Chronic Treatments on Sperm Parameters and Testis Histological Features of Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2014/218293>
- Rajsekhar, S., & Kuldeep, B. (2011). Pharmacognosy and Pharmacology of *Nigella Sativa* - a Review. *International Research Journal of Pharmacy*, 2(11), 36–39.
- Rashid, S., Zafar, M., Ahmad, M., Sultana, S., Ahmed, S. N., & Kilic, O. (2021). Micro and Macroscopic Characterization of Traded *Nigella sativa* Seeds Using Applied Systematics Techniques. In M. F. Ramadan (Ed.), *Black Cumin (Nigella sativa) Seeds : Chemistry , Technology , Functionality , and Applications* (pp. 31–44). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-48798-0_3
- Ravindra, P. N. (2017). *The Encyclopedia of Herbs & Spices*. CABI.
- Rehman, M. U., & Majid, S. (2020). Therapeutic Applications of Honey and its Phytochemicals. In and M. U. R. Ambreen Shoaib, Saad Saeed Alqahtani, Lubna Azmi, Tarique Anwer, Andleeb Khan, Saeed Al Shahrani, Ajaz Ahmad (Ed.), *Therapeutic Applications of Honey and its Phytochemicals: Vol. II* (p. 451\453). Springer. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-981-15-7305-7_5
- Ren, J., & Dai, C. (2020). Pathophysiology of Chronic Kidney Disease. In J. Yang & W. He (Eds.), *Chronic Kidney Disease: Diagnosis and Treatment* (1st ed., pp. 13–32). Springer Singapore. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-981-32-9131-7>
- Safithri, F., Fauziyah, A. N., Hermayanti, D., Kedokteran, F., Muhammadiyah, U., Dokter, P., & Muhammadiyah, U. (2018). Penurunan Stres Oksidatif Setelah Pemberian Ekstrak Biji Jintan Hitam (*Nigella sativa* L.). 14(2), 82–86.
- Setiawati, E., Kurniawati, A., Widodo, W. D., & Faridah, D. D. N. (2018). Pertumbuhan Jintan Hitam (*Nigella sativa* L.) pada Tingkat Naungan dan Pemupukan Nitrogen yang Berbeda. *Jurnal Agronomi Indonesia (Indonesian Journal of Agronomy)*, 46(2), 202–207. <https://doi.org/10.24831/jai.v46i2.16722>
- Sherwood, L. (2018). *Human Physiology: From Cells to Systems 9th Edition* (9th ed.). Cengage Learning.
- Tariq, M. (2008). *Nigella Sativa* Seeds: Folklore Treatment in Modern Day Medicine. *Saudi Journal of Gastroenterology*, 14(3), 105–106.

<https://doi.org/10.4103/1319-3767.41725>

Tingskov, S. J., Jensen, M. S., Pedersen, C. E. T., de Araujo, I. B. B. A., Mutsaers, H. A. M., & Nørregaard, R. (2021). Tamoxifen attenuates renal fibrosis in human kidney slices and rats subjected to unilateral ureteral obstruction. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 133. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111003>