

## Efek Pemberian Ekstrak Etanol Rimpang Jeringau Terhadap Gambaran Morfohistologi Ginjal Tikus Pasca Induksi Natrium Nitrit

Muhammad Zaharul Ichsan<sup>1\*</sup>, Husnarika Febriani<sup>2</sup>, Syukriah<sup>3</sup>

<sup>1,2,3</sup>Jurusan biologi, Fakultas sains dan teknologi, Universitas islam negeri sumatra utara

\*Corresponding author: zaharull.ichsan@gmail.com

### ABSTRACT

Long-term use of NaNO<sub>2</sub> in food preservatives causes a variety of health problems, particularly for kidney function. Natural antioxidants that can reduce the effects of free radicals are required to prevent these effects. The sweet flag plant is a medicinal plant with high antioxidant potential. This study aims to determine the effect of sweet flag rhizome extract (SFRE) on the morphology and histology of the kidneys of white rats induced by NaNO<sub>2</sub>. This study used 25 rats with 5 groups. Negative control was given CMC0,5% for 40 days, positive control was given NaNO<sub>2</sub> dose of 50 mg/kgBW on days 1-30 and CMC0.5% on days 16-40, treatment groups 1, 2 and 3 were given NaNO<sub>2</sub> Dosage of 50 mg/kgBW on days 1-15, on days 16-30 was given NaNO<sub>2</sub> Dosage of 50 mg/kg BW+SFRE, on days 31-40 only given SFRE in graded doses (T1=250, T2=500, and T3=750 mg/kgBW). The results obtained include SFRE has no effect on kidney morphology. However, SFRE affects the diameter of the distal and proximal tubules with both tubules getting P value=0.000. SFRE had an effect on the score of histological damage with Pvalue=0.017. The safe and optimal dose of SFRE to improve renal histology is a dose of 250 mg/kg BW.

**Keywords:** sweet flag, sodium nitrite, kidney, histopathology.

1

### PENDAHULUAN

Pengawet merupakan Bahan Tambah Pangan (BTP) yang berfungsi untuk mencegah atau menghambat fermentasi, pembusukan, dan kerusakan lain pada makanan yang disebabkan mikroorganisme. Salah satu pengawet sintesis yang berbahaya bagi tubuh apabila dikonsumsi dengan jangka waktu yang panjang adalah natrium nitrit (NaNO<sub>2</sub>). Natrium nitrit adalah BTP yang umumnya digunakan sebagai pengawet daging dengan menekan perkembangan bakteri *Clostridium botulinum* yang menyebabkan pembusukan pada daging (Dewi dkk, 2020).

Penggunaan pengawet natrium nitrit pada makanan diijinkan. Namun, perlu diperhatikan penggunaannya dalam pengawet makanan agar tidak melampaui batas pemakaian. Asupan harian yang dapat diterima pada natrium nitrit diatur pada *Scientific Committee for Food* (SCF) (SCF, 1997) dan *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA) (JECFA, 2002) adalah 0–0,06 dan 0-0,07 mg/kg berat

badan per hari. Penggunaan jangka panjang natrium nitrit sebagai pengawet makanan dapat menyebabkan kerusakan jaringan dan meningkatkan peroksidasi lipid dikarenakan natrium nitrit dapat bersifat karsinogen dan bertindak sebagai radikal bebas yang meningkatkan stres oksidatif (Baek dkk, 2015; Wahyuningsih dkk, 2021).

Natrium nitrit di dalam darah akan mengikat oksigen dan membentuk ikatan radikal bebas nitrit oksida (NO) yang akan menyebabkan sitoksisitas. NO di dalam darah ketika berikatan dengan superoksida akan membentuk ikatan peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>). Peroksinitrit ketika berikatan dengan *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) akan meningkatkan peroksidasi lipid dan meningkatkan kadar malondialdehid (MDA). Hal itu menyebabkan kerusakan jaringan dan kehilangan fungsi organ (Ansari dkk, 2017). Salah satu organ yang menjadi target utama dari dampak zat toksik adalah organ ginjal (Wahyuningsih dkk, 2020).

Ginjal merupakan organ ekskresi yang berfungsi dalam membuang zat sisa hasil metabolisme yang tidak diperlukan, termasuk zat berbahaya yang masuk ke

dalam tubuh. Hal itu menyebabkan ginjal menjadi salah satu organ yang terkena dampak besar dari efek zat toksik seperti natrium nitrit. Bagian ginjal yang berfungsi sebagai filtrasi dan reabsorpsi adalah korpuskulum ginjal dan tubulus proksimal pada korteks ginjal. Zat-zat berbahaya diserap kembali di tubulus proksimal dan selanjutnya ginjal akan menyaring plasma darah dan hasil penyaringan yang tidak dibutuhkan oleh tubuh akan disalurkan melalui urin dan beberapa zat toksik akan tertinggal dan menumpuk di ginjal. Korteks ginjal merupakan bagian ginjal yang sangat sensitif terhadap zat toksik sehingga kerusakan sel dapat terjadi dalam bentuk pembengkakan sel bahkan nekrosis (Kumar dkk, 2005; Marieb dan Hoehn, 2014). Untuk mencegah efek tersebut, diperlukan antioksidan dari alam yang dapat menghambat efek dari radikal bebas hasil metabolisme dari natrium nitrit. Antioksidan dapat diperoleh dari berbagai tanaman. Salah satu tanaman obat yang memiliki potensi luar biasa sebagai antioksidan adalah tanaman jeringau (Loying dkk., 2019).

Jeringau (*Acorus calamus* L.) atau dikenal dengan nama *sweet flag* merupakan tanaman dari Famili Acoraceae. Jeringau merupakan tanaman herba dengan rimpang yang panjang, halus dan berwarna hijau pucat dengan daun dan rimpangnya memiliki aroma yang kuat. Berdasarkan uji fitokimia rimpang jeringau mengandung, rimpang jeringau memiliki kandungan metabolit sekunder antara lain: glikosida, minyak atsiri, *sesquiterpenes*, *monoterpenes*, flavonoid, steroid, saponin, alkaloid, tanin dan komponen polifenol. Dua komponen aktif aromatik utama yang diisolasi dari rimpang jeringau yaitu  $\alpha$ -asarone dan  $\beta$ -asarone. Selain itu rimpang jeringau mengandung minyak esensial lainnya seperti *calamenol*, *calameon* dan *calamen* (Imam dkk, 2013; Nath dkk, 2017).

Pengaruh pemberian rimpang jeringau (*Acorus calamus* L.) terhadap kesehatan telah banyak diteliti dalam bidang farmakologi diantaranya sebagai anti-diabetes, anti-depresan, anti-kanker, antioksidan, anti-inflamasi, anti-diare, hepatoprotektor, dan kardioprotektor (Sharma dkk., 2020; Yadav dkk, 2019). Rimpang pada

jeringau memiliki efek signifikan sebagai nefroprotektor dan anti-diuretik dengan memecahkan batu ginjal dan membersihkan urin dari zat toksik (Ghelani dkk, 2016). Selain itu, jeringau juga berperan sebagai anti-hipertensi dengan menurunkan kadar nitrit oksida dan menurunkan aktivitas plasma renin (Singh dkk, 2017).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi dari ekstrak etanol rimpang jeringau (EERJ) dapat melindungi ginjal dari paparan radikal bebas akibat induksi natrium nitrit dilihat dari analisis kerusakan histologi ginjal, diameter tubulus distal, diameter tubulus proksimal, dan morfologi ginjal. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat menjadi informasi tentang efek samping natrium nitrit sebagai pengawet pada organ ginjal serta khasiat rimpang jeringau sebagai antioksidan.

## METODE PENELITIAN

### Pembuatan Ekstrak Etanol Rimpang Jeringau

Rimpang jeringau diperoleh dari wilayah pematang siantar kabupaten simalungun, sumatera utara. Pembuatan ekstrak diawali dengan pengumpulan sampel rimpang jeringau sebanyak 15 kg dan dicuci hingga bersih pada air mengalir. Lalu, rimpang di potong kecil-kecil lalu dikeringkan langsung dibawah paparan sinar matahari selama 4 hari menggunakan kain penutup berwarna hitam. Penutupan dengan kain hitam bertujuan untuk mempercepat pengeringan dan juga kain hitam dapat menyerap panas matahari yang dapat menghalangi sinar matahari agar tidak langsung mengenai rimpang sehingga kerusakan senyawa aktif rimpang karena cahaya UV dapat diminimalkan (Suryaningrum dan Widyaningsih, 2012). Serbuk simplisia yang diperoleh selanjutnya dimaserasi dengan pelarut etanol 96%. Serbuk simplisia rimpang jeringau direndam dengan perbandingan 1:10. Sebanyak 800 g serbuk direndam dengan pelarut etanol sebanyak 8000 ml/hari. Selanjutnya rendaman disaring dengan kertas saring kemudian rendaman simplisia dimaserasi kembali. Tahapan ini dilakukan sebanyak 3 kali dengan pengulangan selama tiga hari berturut-turut sampai filtratnya berwarna bening. Hasil maserasi kemudian

dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* untuk mendapatkan ekstrak kasar.

### Hewan Uji Coba

Penelitian ini telah memiliki ijin dan disetujui oleh ketua komite etik penelitian hewan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sumatera Utara (*Animal Research Ethics Committees/AREC*) dengan nomor 0424/KEPH-FMIPA/2021. Selama penelitian, hewan uji coba diberi kenyamanan dan perlakuan baik sesuai dengan kode etik hewan.

Hewan uji coba pada penelitian ini menggunakan tikus putih jantan galur wistar berumur 3 bulan dengan bobot berat badan 129-176 gram, dan berjumlah 25 ekor. Masing-masing kandang berukuran 40 cm x 60. Perlakuan dimulai setelah aklimatisasi selama 1 minggu.

### Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan lima macam kelompok perlakuan dengan lima kali pengulangan. Perlakuan terdiri dari:

Kontrol negatif ( $n = 5$ ): (CMC Na 0,5%) diberikan secara oral selama 40 hari pada pagi hari

Kontrol positif ( $n = 5$ ): (50 mg/kg  $\text{NaNO}_2$  + CMC NA 0,5%)  $\text{NaNO}_2$  dilarutkan pada 100 ml aquades. 1 ml larutan stok mengandung konsentrasi  $\text{NaNO}_2$  0,0005g yang setara dengan *accept daily intake* (ADI) dari 50 mg/kg BB  $\text{NaNO}_2$  ketika diberikan kepada tikus dengan berat 100 g, penginduksian  $\text{NaNO}_2$  dilakukan secara oral. Pada hari ke 1-15 penginduksian  $\text{NaNO}_2$  50 mg/kg BB dilakukan pada sore hari, hari ke 16-30 diinduksi  $\text{NaNO}_2$  50 mg/kg BB (pagi) + CMC Na 0,5% (sore), hari ke 31 – 40 diinduksi CMC Na 0,5% (pagi).

Perlakuan 1 (EERJ 250 mg/kg +  $\text{NaNO}_2$  50 mg/kg) ( $n = 5$ ): pada hari ke 1-15 diinduksi  $\text{NaNO}_2$  50 mg/kg BB (pagi), hari ke 16 – 30 diinduksi  $\text{NaNO}_2$  50 mg/kg BB (pagi) + EERJ 250 mg/kg BB (sore) penginduksian EERJ dilakukan secara oral.

Perlakuan 2 (EERJ 500 mg/kg +  $\text{NaNO}_2$  50 mg/kg) ( $n = 5$ ): pada hari ke 1-15 diinduksi  $\text{NaNO}_2$  50 mg/kg

BB (pagi), hari ke 16 – 30 diinduksi  $\text{NaNO}_2$  50 mg/kg BB (pagi) + EERJ 500 mg/kg BB (sore).

Perlakuan 3 (EERJ 750 mg/kg +  $\text{NaNO}_2$  50 mg/kg) ( $n = 5$ ): pada hari ke 1-15 diinduksi  $\text{NaNO}_2$  50 mg/kg BB (pagi), hari ke 16 – 30 diinduksi  $\text{NaNO}_2$  50 mg/kg BB (pagi) + EERJ 750 mg/kg BB (sore).

### Pemeriksaan Morfologi, Histopatologi dan Histomorfometri

Hewan uji coba di euthanasia menggunakan eter dengan cara diinhalasi overdosis eter, lalu organ ginjal diambil untuk pengamatan morfologi. Pengamatan morfologi ginjal menggunakan metode skoring anggraini (2008) meliputi perubahan warna, bentuk dan konsistensi. Tingkat kerusakan morfologi ginjal dikategorikan sebagai berikut: normal (-), bila ditemukan 1 kriteria (+), bila ditemukan 2 kriteria (++), dan bila ditemukan 3 kriteria (+++). Pengamatan morfologi dilakukan secepat mungkin lalu sampel organ ginjal di fiksasi menggunakan *neutral buffered formalin* 10 % selama 24 jam dan diproses untuk embedding pada parafin. Lalu, organ sampel dipotong setebal 10  $\mu\text{m}$  dengan pewarnaan menggunakan hematoksilin dan eosin (H&E).

Metode skoring kerusakan histologi pada penelitian ini menggunakan metode skoring Anggraini (2008). kerusakan jaringan yang diamati meliputi: degenerasi, pelebaran ruang bowman, vakuolisasi, akumulasi sel debris dalam lumen, badan inklusi, pelebaran lumen tubulus, karyomegali, dan hiperplasia. Tingkat kerusakan histopatologi ginjal dikategorikan sebagai berikut: normal (1), bila ditemukan 1-2 kriteria (2), bila ditemukan 3-5 kriteria (3), dan bila ditemukan 6-8 kriteria (4). Pengamatan histopatologi ginjal menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 40X dari setiap 5 lapang pandang.

Pada pengamatan histomorfometri, menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 40X dengan parameter yang di ukur adalah diameter tubulus proksimal dan tubulus distal. Jumlah diameter yang di ukur sebanyak 100 tubulus dari masing masing kelompok, yang dipilih secara *random* dari setiap 5 lapang pandang. Pengukuran diameter tubulus proksimal dan tubulus distal menggunakan software *Image J* versi 1.8.0\_172 (LOCI, University of Wisconsin) yang telah dikalibrasi menggunakan erma stage micrometer SM-001, Selanjutnya dihitung nilai rata-rata diameter yang di dapat.

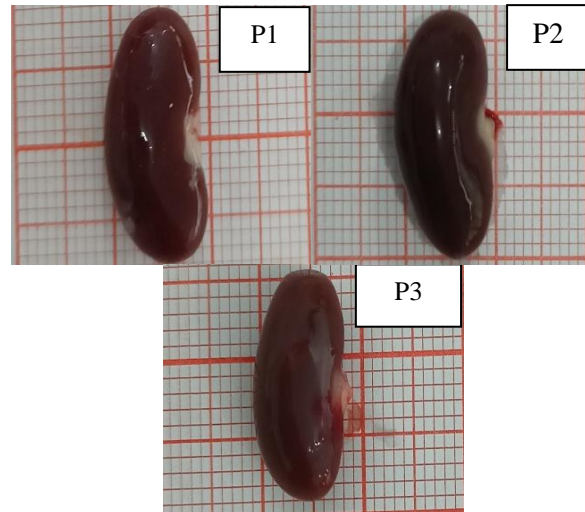
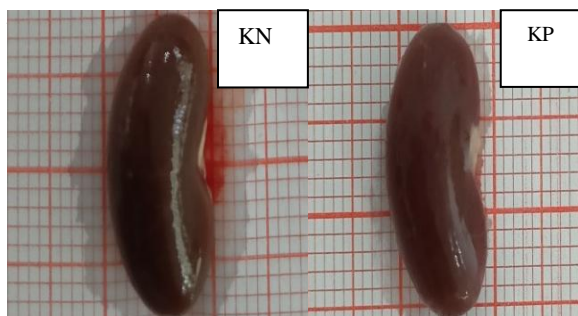
**Analisis Data**

Data hasil skoring kerusakan histologi ginjal yang diperoleh merupakan data ordinal. Selanjutnya, data tersebut dikonversi menjadi data interval dengan menggunakan *method of successive interval* (MSI). Data skoring kerusakan histologi yang sudah dikonversi dan hasil pengamatan histomorfometri tubulus proksimal dan tubulus distal kemudian dianalisis dengan uji *one-way analysis of variance* (ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji *duncan* untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan. Analisis statistik menggunakan aplikasi SPSS versi 26 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Selanjutnya hasil analisis disajikan secara deskriptif kuantitatif.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Pengamatan morfologi ginjal**

Berdasarkan hasil pengamatan morfologi meliputi bentuk, konsistensi, dan warna pada morfologi organ ginjal tikus putih (*Rattus norvegicus* L.) setelah pemberian EERJ dan diinduksi natrium nitrit dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Ginjal tikus setelah pemberian EERJ dan natrium nitrit. KN: kontrol negatif, KP: kontrol positif, P1: dosis ekstrak 250 mg/kg BB, P2: dosis ekstrak 500 mg/kg BB, P3:dosis ekstrak 750 mg/kgBB.

Tabel 1. Derajat kerusakan morfologi ginjal

Kelompok	Derajat kerusakan ginjal secara morfologi (%)			
	0 (normal)	+ (ringan)	++ (sedang)	+++ (berat)
Kontrol positif	100%	-	-	-
Kontrol negatif	100%	-	-	-
Perlakuan 1	100%	-	-	-
Perlakuan 2	100%	-	-	-
Perlakuan 3	100%	-	-	-

+ =ditemukan 1 kriteria kerusakan (perubahan struktur, warna & konsistensi)  
 ++ =ditemukan 2 kriteria kerusakan (perubahan struktur, warna & konsistensi)  
 +++ =ditemukan 3 kriteria kerusakan (perubahan struktur, warna & konsistensi)

Pada tabel 1 menunjukkan bahwa tidak adanya perbedaan struktur, warna dan konsistensi antara ginjal kelompok kontrol dengan kelompok yang diberi perlakuan EERJ dan natrium nitrit. Pemberian EERJ dan natrium nitrit tidak mempengaruhi warna pada ginjal. Warna merah kecoklatan pada ginjal menandakan organ ginjal tetap memiliki aliran darah yang tinggi. Guyton dan Hall (2007) berpendapat bahwa organ ginjal berwarna merah disebabkan oleh volume aliran darah

yang tinggi yang berlangsung di dalam ginjal dikarenakan ginjal menerima aliran darah sebanyak 22 % dari seluruh aliran darah yang dipompa oleh jantung. Ginjal normal memiliki konsistensi yang kenyal, memiliki struktur berbentuk kacang merah dengan permukaan anterior dan posterior kutub atas dan bawah serta tepi lateral ginjal berbentuk cembung, sedangkan tepi medialnya berbentuk cekung karena adanya hilus.

Berdasarkan hasil pengamatan pada tabel 1 dapat dilihat bahwa tidak adanya perubahan yang bermakna dari gambaran morfologi ginjal. Hal ini diduga karena pemberian  $\text{NaNO}_2$  dengan dosis 50 mg/kg BB dengan jangka waktu 30 hari tidak memberi kerusakan pada ginjal sampai tahap morfologi. Hal ini sesuai dengan pernyataan Tripartata dkk (2007) yang melaporkan bahwa penginduksian pengawet natrium nitrit tunggal tanpa bahan tambahan pangan yang lain dapat mempengaruhi organ ginjal apabila diberikan dalam dosis yang tinggi dan dalam jangka waktu yang lama.

Hasil pengamatan terhadap morfologi organ ginjal kelompok positif tidak memperlihatkan perbedaan dengan kelompok normal sehingga untuk menilai efek toksik natrium nitrit terhadap ginjal dapat dipertimbangkan berapa faktor untuk dapat mengetahui efek toksik dari zat karsinogen tersebut dikarenakan ginjal memiliki kemampuan yang tinggi untuk mengindikasikan suatu penyakit. Kelainan struktur ginjal dapat diperiksa melalui pemeriksaan histopatologi. Pemeriksaan histopatologi merupakan *gold standart* untuk prognosis, diagnosis, dan panduan terapi berbagai penyakit ginjal (Brachemi, 2014).

#### Pengamatan histomorfometri ginjal

Hasil pengamatan menunjukkan adanya perbedaan rata-rata diameter tubulus untuk setiap kelompok perlakuan. Diameter tubulus pada kelompok perlakuan meningkat sesuai dengan dosis ekstrak pemberian. Hasil pengamatan diameter dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil pengamatan diameter tubulus distal dan proksimal.

Kelompok	Diameter tubulus distal ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ SD	Diameter tubulus proksimal ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ SD
Kontrol negatif	34.1 $\pm$ 1.78 <sup>a</sup>	42.5 $\pm$ 1.96 <sup>a</sup>
Kontrol positif	43.2 $\pm$ 1.58 <sup>c</sup>	50.1 $\pm$ 1.53 <sup>c</sup>
Perlakuan 1	38.3 $\pm$ 2.35 <sup>b</sup>	45.8 $\pm$ 1.51 <sup>b</sup>
Perlakuan 2	40.7 $\pm$ 1.99 <sup>bc</sup>	46.5 $\pm$ 2.23 <sup>b</sup>
Perlakuan 3	41.5 $\pm$ 1.62 <sup>c</sup>	46.6 $\pm$ 2.39 <sup>b</sup>

Keterangan: SD: Standar deviasi, Kontrol negatif (CMC Na 0,5 %), Kontrol positif ( $\text{NaNO}_2$  50 mg), perlakuan 1 ( $\text{NaNO}_2$  50 mg + EERJ 250 mg/kg BB), perlakuan 2 ( $\text{NaNO}_2$  50 mg + EERJ 500 mg/kg BB) dan perlakuan 3 ( $\text{NaNO}_2$  50 mg + EERJ 750 mg/kg BB). <sup>abc</sup> angka yang diikuti huruf berbeda pada satu kolom menunjukkan beda nyata ( $P < 0,05$ ).

Hasil uji *one way anova* pada pengamatan kedua diameter tubulus menunjukkan taraf signifikan  $p=0,000$  yang menunjukkan bahwa pemberian natrium nitrit dan EERJ memberikan pengaruh nyata terhadap ukuran diameter tubulus distal dan proksimal ( $p < 0,05$ ).

Hasil analisis lanjut dengan uji *duncan* dengan taraf signifikansi 5% pada hasil pengamatan diameter tubulus distal menunjukkan bahwa terdapat perbedaan sangat nyata antara kontrol negatif (34.1  $\pm$  1.78) dengan kelompok positif (43.2  $\pm$  1.58). Sedangkan pada hasil pengamatan diameter tubulus proksimal menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata antara kelompok kontrol negatif (42.5  $\pm$  1.96) dengan kelompok positif (46.6  $\pm$  2.39). Hasil analisis pada tubulus distal dan tubulus proksimal membuktikan bahwa natrium nitrit dengan dosis 50 mg/kg BB selama 30 hari dapat merusak jaringan tubulus ginjal ditandai dengan pelebaran diameter tubulus distal dan diameter tubulus proksimal.

Hasil metabolisme natrium nitrit dalam tubuh seperti *Reactive oxygen species* (ROS) dan nitrit oksida (NO) merupakan penyebab utama terjadinya Pelebaran diameter tubulus dan degenerasi sel tubulus (EL Barky

dkk, 2020). Kandungan nitrit di dalam darah jika bertemu dengan oksigen akan membentuk ikatan NO (Ansari dkk., 2017). NO yang berikatan dengan ROS akan membentuk senyawa peroksinitrit. Senyawa peroksinitrit dapat mempercepat peroksidasi lipid berupa meningkatnya produksi malondialdehid (MDA), hal ini menyebabkan menyebabkan otot polos pembuluh darah relaksasi yang menyebabkan pelebaran lumen tubulus dan meningkatkan aliran darah (Ismail dkk, 2003).

Ketidak normalan ukuran sel epitel pada tubulus menyebabkan perubahan pada diameter tubulus (Rohman dkk, 2021). Kerusakan tahap awal pada ginjal ditandai dengan pembengkakan pada sel, sehingga menyebabkan hilangnya polaritas sel tubulus. Hal ini mengakibatkan penyerapan nutrisi pada membran dari permukaan basoleteral ke permukaan lateral sel tubulus proksimal terganggu yang menyebabkan penyaluran natrium ke tubulus distal meningkat dan menyebabkan vasokonstriksi (Mappa dkk, 2013). Kerusakan histologi ginjal akibat zat karsinogen dapat mengakibatkan nekrosis tubular akut ditandai dengan dekstruksi epitel tubulus proksimal. Sel epitel pada tubulus proksimal sangat rentan terhadap anoksia dan mudah hancur karena terinduksi zat karsinogen yang dieksresikan melalui ginjal (Suhita dkk, 2013).

Penelitian ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang pernah dilakukan oleh Rani dan D'souza (2020) yang melaporkan bahwa pemberian natrium nitrit 50 mg/kg BB berpengaruh terhadap pelebaran tubulus distal dan tubulus proksimal. El-Barky dkk (2020) juga melaporkan pemberian natrium nitrit tunggal dengan dosis 20 mg/kg BB selama 4 minggu dan tikus yang di beri minuman mengandung natrium nitrit 200 mg/kg selama 6 bulan menyebabkan jaringan ginjal mengalami vakuolisasi sitoplasma dan degenerasi tubulus.

Berdasarkan tabel 2 dapat dilihat bahwa diameter tubulus distal kelompok negatif ( $34.14 \pm 1.78$ ) berbeda nyata dengan kelompok perlakuan 1 ( $38.3 \pm 2.35$ ). Namun pada kelompok perlakuan 2 ( $40.7 \pm 1.99$ ) dan

kelompok perlakuan 3 ( $41.5 \pm 1.62$ ) berbeda sangat nyata dengan kelompok negatif ( $34.14 \pm 1.78$ ). Sedangkan pada diameter tubulus proksimal pada kelompok negatif ( $42.5 \pm 1.96$ ) berbeda nyata dengan kelompok perlakuan 1 ( $45.8 \pm 1.51$ ), perlakuan 2 ( $46.5 \pm 2.23$ ) dan perlakuan 3 ( $46.6 \pm 2.39$ ). dapat dilihat bahwa diameter tubulus terendah pada kelompok perlakuan adalah perlakuan 1 ( $45.8 \pm 1.51$ ). Hal ini diduga EERJ dengan dosis 250 mg/kg BB merupakan dosis yang optimal untuk menangkal radikal bebas dan memperbaiki kerusakan tubulus akibat natrium nitrit.

Hasil ini didukung penelitian sebelumnya oleh Patel, dkk., (2012) yang melaporkan bahwa pemberian ekstrak rimpang jeringau dengan dosis 250 mg/kg BB dapat menurunkan kadar radikal bebas nitrit oksida akibat induksi natrium nitrit dilihat dari aktivitas plasma renin yang diproduksi oleh ginjal.

Pemberian ekstrak rimpang jeringau sebagai antioksidan memberikan hasil berbeda nyata dengan kelompok kontrol positif yang ditunjukkan oleh diameter tubulus. Hal ini dikarenakan ekstrak rimpang jeringau memiliki kandungan metabolit sekunder seperti tanin dan flavonoid yang memiliki fungsi sebagai antioksidan. Tanin dan senyawa fenol turunan flavonoid seperti kuersetin dan turin dapat menurunkan kadar NO di dalam darah dengan mendonor elektron antioksidan yang memblokir dan memutuskan ikatan berantai NO di dalam tubuh (Duarte dkk, 2002; Parul dkk, 2012).

Kandungan alkaloid memiliki keunggulan unik untuk menangkal radikal bebas, mereka memberikan efek anti-inflamasi melalui beberapa target, tanpa reaksi yang merugikan dan mengatur tingkat NO. Turunan alkaloid seperti *Bulleyaconitine A*, *Tetrandrine*, dan *Sinomenine* berperan sebagai anti-inflamasi dengan menambah fungsi fagositosis makrofag serta menurunkan kadar NO (Li dkk, 2020).

### **Pengamatan histopatologi ginjal**

Pengamatan derajat skor kerusakan ginjal dilakukan secara mikroskopis menggunakan preparat yang telah diwarnai dengan Hematoksin-Eosin. Pengamatan histologi diamati dengan perbesaran 10x dengan 5

lapang pandang penuh menggunakan metode skoring Anggraini (2008), dimana derajat kerusakan dihitung dengan beberapa kriteria di antaranya: vakuolisasi , pelebaran ruang bowman, degenerasi, badan inklusi, pelebaran lumen tubulus, akumulasi sel debris dalam lumen, dan, hiperplasia. Hasil pengamatan rata-rata kerusakan histologi ginjal dapat dilihat pada tabel 3.

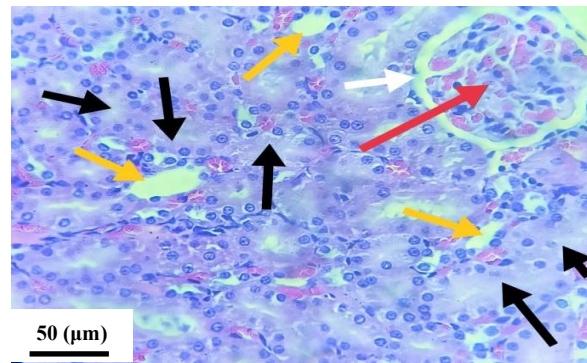
Tabel 3. Rata-rata skor kerusakan histopatologi ginjal.

Kelompok	Rata- rata skor kerusakan histologi ginjal ± SD	<i>P=</i> value
Kontrol negatif	2.83 ± 0.21 <sup>a</sup>	0.017
Kontrol positif	3.88 ± 0.53 <sup>c</sup>	
Perlakuan 1	3.16 ± 0.44 <sup>ab</sup>	
Perlakuan 2	3.32 ± 0.37 <sup>abc</sup>	
Perlakuan 3	3.60 ± 0.61 <sup>bc</sup>	

Keterangan: SD: Standar deviasi, Kontrol negatif (CMC Na 0,5 %), Kontrol positif (NaNO<sub>2</sub> 50 mg), perlakuan 1 (NaNO<sub>2</sub> 50 mg + EERJ 250 mg/kg BB), perlakuan 2 (NaNO<sub>2</sub> 50 mg + EERJ 500 mg/kg BB) dan perlakuan 3 (NaNO<sub>2</sub> 50 mg + EERJ 750 mg/kg BB). <sup>abc</sup> angka yang diikuti huruf berbeda pada satu kolom menunjukkan beda nyata (P<0,05).

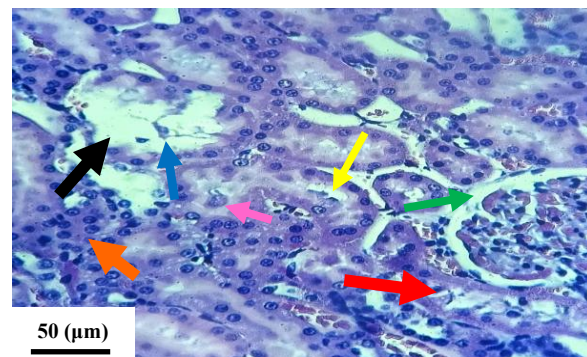
Berdasarkan tabel 3. Hasil uji *one way anova* menunjukkan hasil yang signifikan (p=0,017) yang membuktikan pemberian EERJ dan natrium nitrit memberikan hasil yang nyata (p<0,05) terhadap organ ginjal tikus. Hasil uji *duncan* menunjukkan perbedaan sangat nyata antara kelompok negatif (2.83 ± 0.21) dengan pemberian CMC 0,5% dengan kelompok positif (3.88 ± 0.53) dengan pemberian NaNO<sub>2</sub> dengan dosis 50 mg/kg BB selama 30 hari. Hal ini membuktikan bahwa pemberian NaNO<sub>2</sub> dengan dosis 50 mg dapat meningkatkan stress oksidatif dalam tubuh dan merusak jaringan ginjal.

Pada hasil pengamatan histologi ginjal kelompok kontrol negatif (gambar 2) menunjukkan struktur jaringan yang normal, glomerulus berbentuk bulat mengembang dan tidak mengecil, kapsula bowman tidak melebar, tubulus distal dengan lumen yang lebar dan tubulus proksimal dengan lumen normal yang dilapisi oleh epitel *cuboidal*



Gambar 2. Histologi ginjal kelompok negatif . tubulus distal (panah kuning), tubulus proksimal (panah hitam), Glomerulus (panah merah) dan kapsula bowman (Panah

Pada hasil pengamatan histopatologi ditemukan berbagai kerusakan tubulus pada kelompok kontrol positif dan semua kelompok perlakuan, kerusakan tubulus meliputi: vakuolisasi tubulus, degenerasi sel tubulus, pelebaran lumen tubulus disertai akumulasi sel debris di dalam lumen, dan badan inklusi pada tubulus (gambar 3,4,5 &6).



Gambar 3. Histopatologi ginjal kelompok positif pemberian Natrium nitrit 50 mg/kg BB 30 hari. Pelebaran lumen tubulus (panah hitam), vakuolisasi (panah kuning), pelebaran ruang bowman (panah hijau), degenerasi (panah merah), hiperplasia (panah orange), badan inklusi (panah pink) H&E (400x)

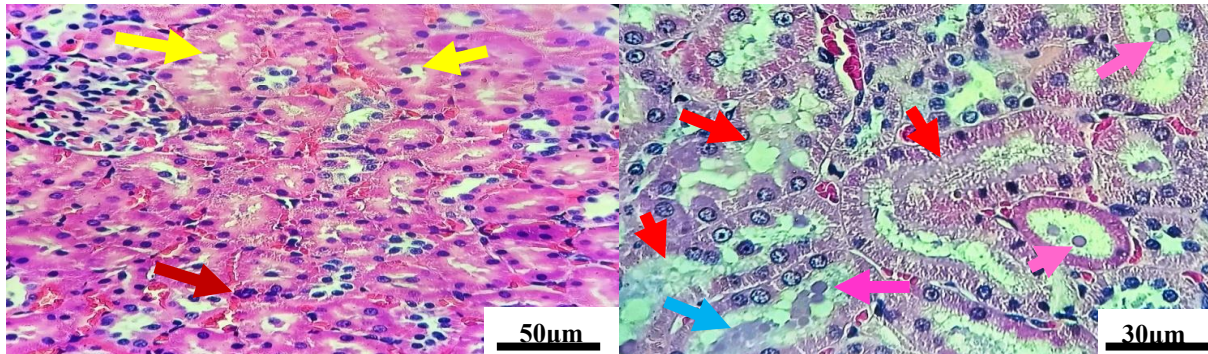
Hal ini disebabkan oleh efek samping natrium nitrit, dimana nitrit di dalam tubuh akan menyebabkan berbagai reaksi berantai yang akan membentuk berbagai radikal bebas. Gugus nitrit dalam NaNO<sub>2</sub>, ketika diinduksi secara oral ke dalam tubuh, akan masuk ke lambung dan kemudian melewati usus kecil, dimana kandungan nitrit akan disalurkan ke dalam darah dan jaringan yang akan membentuk ikatan NO yang merupakan produk dari ROS dan *reactive nitrogen species* (RNS). NO ketika mengikat salah satu produk ROS yaitu superoksida yang akan menjadi radikal bebas



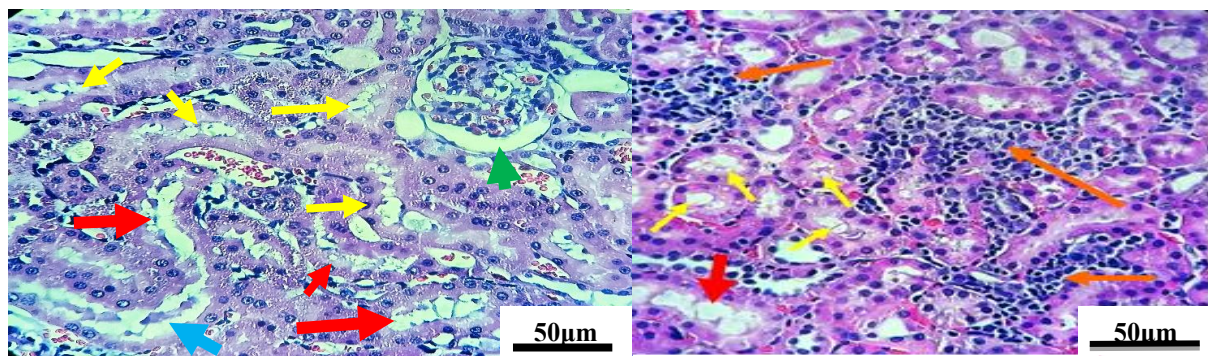
peroksinitrit. Senyawa peroksinitrit ketika bereaksi dengan asam lemak tak jenuh ganda akan menyebabkan peningkatan peroksidasi lipid (Liaudet dkk, 2013).

Nitrit di dalam darah akan membentuk ikatan ion

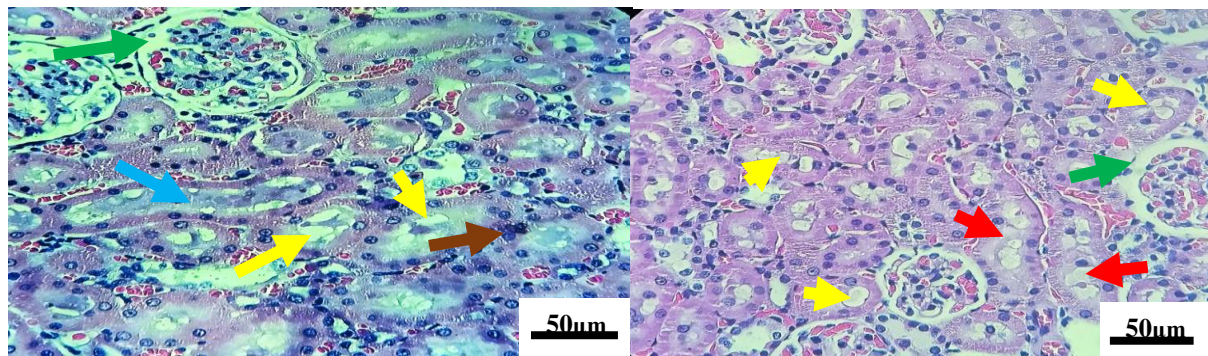
Peningkatan peroksidasi lipid dapat menyebabkan peningkatan stress oksidatif yang menyebabkan kerusakan pada jaringan (Özen dkk., 2014). Elsabagh dkk, (2016) melaporkan bahwa pemberian natrium nitrit



Gambar 4. Histopatologi ginjal kelompok perlakuan 1. vakuolisasi (panah kuning), akumulasi sel debris di dalam lumen (Panah biru), degenerasi (panah merah), badan inklusi (panah pink), dan karyomegali (panah coklat), pewarnaan H&E (400x).



Gambar 5. Histopatologi ginjal kelompok perlakuan 2. akumulasi sel-sel debris dalam lumen (panah biru), vakuolisasi (panah kuning) ,pelebaran ruang bowman (panah hijau), degenerasi (panah merah) dan hiperplasia (panah orange), pewarnaan H&E (400x).



Gambar 6. Histopatologi ginjal kelompok perlakuan 3. akumulasi sel-sel debris dalam lumen (panah biru), vakuolisasi (panah kuning) ,pelebaran ruang bowman (panah hijau), degenerasi (panah merah), dan karyomegali (panah coklat), pewarnaan H&E (400x).

nitrosonium ( $\text{NO}^+$ ) dan ketika berikatan dengan amina akan membentuk senyawa nitrosamin ( $\text{R}_2\text{N}-\text{N}=\text{O}$ ). N-nitrosamin memiliki sifat karinogen dan kemampuan unik untuk meningkatkan stres oksidatif yang sangat cepat dan menyebabkan peroksidasi lipid yang dapat mengganggu homeostasis sel (Suparmi dkk, 2016).

dengan konsentrasi 125 ppm selama 30 hari menyebabkan ginjal mengalami degenerasi sel tubulus disertai akumulasi sel debris di dalam lumen. Nitrit di dalam darah juga akan mengoksidasi ion  $\text{Fe}^{2+}$  pada hemoglobin dan membentuk ion  $\text{Fe}^{3+}$ , hal tersebut menyebabkan hemoglobin berubah menjadi methemoglobin. Methemoglobin tidak dapat



menyalurkan oksigen ke sel-sel tubuh, sehingga berkurangnya kadar hemoglobin dan tingginya kadar methemoglobin (sianosis) menyebabkan terjadinya penurunan transportasi oksigen di dalam darah yang dapat menyebabkan cedera iskemik dan hipoksia yang menyebabkan kematian sel (Aita dan Mohammed, 2014; Campos dkk., 2018; Pavlova dkk, 2013).

Hipoksia adalah salah satu penyebab cedera iskemik kronis dikarenakan dinding pembuluh darah mengalami kerusakan dan suplai oksigen dalam darah berkurang yang menyebabkan fibrosis dan *tubulointerstitial* (kerusakan pada tubulus) (Sun dkk., 2012). Ibrahim dkk, (2020) melaporkan bahwa pemberian natrium nitrit dengan dosis 35 mg/kg BB menyebabkan tikus mengalami hipoksia serta tubulus pada ginjal mengalami degenerasi, pelebaran dan nekrosis.

Cedera iskemik dapat menyebabkan kegagalan sel untuk mempertahankan nilai ATP. Oksigen sangat penting bagi mitokondria untuk menghasilkan ATP, kurangnya oksigen dapat berakibatkan berkurangnya kadar glikolisis dalam jaringan. Tubulus proksimal merupakan salah satu jaringan yang sangat bergantung pada produksi ATP mitokondria. Tubulus proksimal memiliki kapasitas glikolisis yang sedikit untuk mempertahankan jaringan dari zat toksik, oleh karena itu tubulus proksimal lebih mudah hancur daripada tubulus distal (Zaidi, 2010).

Histopatologi hiperplasia ditemukan pada kelompok kontrol positif dan perlakuan 2 (gambar 3 & 5) hal ini diduga disebabkan oleh hipoksia dan cedera iskemik yang disebabkan radikal bebas hasil metabolisme nitrit di dalam tubuh. Kekurangan kadar oksigen di dalam darah meningkatkan kadar enzim ATPase, hal tersebut menyebabkan terjadinya pembelahan sel (mitosis) yang tidak terkontrol dan menyebabkan terjadinya hiperplasia (Aliza dan Sipahutar, 2013; Sipahutar dan Aliza, 2013).

Terdapat histopatologi berupa pelebaran ruang bowman pada kelompok kontrol positif, perlakuan 1 dan perlakuan 2 (gambar 3,4 & 5). kapsula bowman

adalah tempat dimana filtrat glomerulus dialirkan saat meninggalkan kapiler – kapiler kecil melalui membran filtrasi. Pelebaran kapsul bowman dapat terjadi disebabkan oleh tekanan volume urine terlalu besar, glomerulus *hyper filtration* dan *glomerulosclerosis* (Kotyk dkk., 2016; Fahrianti dkk., 2015). Wang dkk, (2013) melaporkan bahwa hipoksia dapat menyebabkan pelebaran pembuluh darah termasuk pelebaran glomerulus dan kongesti pada jaringan yang menyebabkan kapsula bowman menyempit. Kerusakan hipoksia lebih lanjut juga dapat menyebabkan glomerulus mengalami atrofi dan fibrosis yang menyebabkan glomerulus mengecil sehingga kapsula bowman tampak lebih lebar (Lin dkk, 2013).

Histopatologi berupa karyomegali dan badan inklusi ditemukan pada kelompok kontrol positif, perlakuan 1 dan 3 (gambar 3, 4 & 6). Pada gambaran histopatologi karyomegali menunjukkan inti hiperkromatik yang abnormal ditandai dengan pembesaran sel di epitel tubulus, sedangkan badan inklusi memiliki ciri eosinofilik, bulat, dan dikelilingi oleh halo transparan dengan marginasi kromatin (Monga dkk., 2006; Radi dkk, 2013). Diduga kedua histopatologi tersebut terjadi karena beberapa peristiwa termasuk paparan zat toksik, virus dan kerusakan DNA (McCulloch dkk, 2011). Efek dari nitrit oksida dapat merusak membran pada sel melalui peroksidasi lipid yang akan merusak enzim sitosol dan protein membran melalui oksidasi protein dan menyebabkan mutasi pada DNA mitokondria. Mutasi tersebut menyebabkan kerusakan sel seperti karyomegali (EL Barky dkk., 2020).

Badan inklusi dapat terbentuk karena multiplikasi virus atau dapat disebabkan karena kelainan genetik. Ketika gen asing atau paparan zat tertentu dimasukkan kedalam sel, sel inang akan merespon pesan dari RNA untuk mengkode protein yang dapat menyebabkan kegagalan untuk mengalami modifikasi lebih lanjut sehingga menyebabkan kegagalan transportasi dan kondensasi sel yang menghasilkan badan inklusi (Krishnamoorthy dan Sangeetha, 2008).

Berdasarkan hasil uji *duncan* pada tabel 3 pengamatan rata rata skoring histopatologi ginjal kelompok perlakuan 1 dengan dosis ekstrak 250 mg/kg BB ( $3.16 \pm 0.44$ ), perlakuan 2 dengan dosis ekstrak 500 mg/kg BB ( $3.32 \pm 0.37$ ) dan dosis ekstrak 750 mg/kg BB ( $3.60 \pm 0.61$ ) tidak berbeda nyata, namun kelompok perlakuan 1 tidak berbeda nyata dengan kelompok negatif ( $2.83 \pm 0.21$ ). Hal ini menunjukkan bahwa dosis optimal yang dapat digunakan untuk menangkal radikal bebas pada ginjal adalah dengan dosis EERJ 250mg/kg BB.

Kerusakan pada jaringan ginjal dapat disebabkan oleh radikal bebas golongan oksigen (ROS) radikal bebas golongan nitrogen (RNS) dan hasil dari metabolisme natrium nitrit di dalam tubuh diantaranya Nitrit oksida, peroksinitrit dan methemoglobin yang menyebabkan hipoksia dan cedera iskemik. radikal bebas di dalam tubuh dapat diatasi dengan antioksidan.

Antioksidan memiliki struktur molekul yang dapat memberikan hidrogen atau elektronnya kepada molekul radikal bebas dan mengubahnya menjadi produk yang lebih stabil yang dapat memutuskan reaksi berantai dari radikal bebas dan menghambat reaksi oksidasi lainnya yang masuk dalam tubuh, dan dimetabolisme melalui proses enzimatik dan non enzimatik sebagai pertahanan oleh zat toksik. Zat sisa toksik tersebut dimetabolisme di dalam ginjal dan diekskresikan dalam bentuk urin (Vishnoi dkk, 2018).

Hasil uji skrining fitokimia EERJ pada penelitian ini positif memiliki kandungan metabolit berupa alkaloid, tanin dan flavonoid. Flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder golongan fenol terbesar yang ada pada tumbuhan. Flavonoid memiliki dua cincin aromatik dan memiliki efek luar biasa sebagai antioksidan untuk menangkal radikal bebas golongan ROS seperti peroksinitrit. Turunan flavonoid seperti kuersetin dapat mengurangi kerusakan dari radikal bebas dengan menambahkan konsentrasi dari *glutathione*. Sebagai tambahan, kuersetin dapat memblokir  $Ca^{2+}$  yang masuk, dan memutuskan jalur  $Ca^{2+}$  yang bertanggung jawab atas kematian sel. Alkaloid dan

flavonoid juga berperan menambah fungsi imunomodulator untuk memproduksi molekul sitokin sebagai respon akibat induksi zat toksik, kerusakan sel dan untuk meregenerasi sel (Muchtarmah dkk, 2017). Barua dkk., (2014) melaporkan bahwa kandungan fenol dan flavonoid pada *Acorus calamus* L. dapat menurunkan aktivitas dari radikal bebas diantaranya seperti radikal hidroksil, radikal bebas superoksida, dan nitrit oksida.

Kandungan tanin pada jeringau memiliki khasiat antioksidan, dan terbukti antioksidan seperti  $\beta$ -karoten, vitamin E dan *astaxanthin* yang dapat menurunkan kadar plasma transaminase akibat kerusakan stress oksidatif (Nasir, 2021), kandungan  $\alpha$ -asarone pada jeringau juga dapat dipercaya menurunkan kadar NO yang berlebihan dalam tubuh (Sharma dkk., 2020).

Hasil ini didukung dengan penelitian sebelumnya oleh Ghelani dkk, (2016) yang menyatakan pemberian ekstrak etanol rimpang jeringau dengan dosis 250, 500, 750 kg/BB memberikan perlindungan luar biasa akibat induksi etilen glikol dilihat dari serum urin dan jaringan ginjal, ekstrak rimpang jeringau juga dapat membersihkan karsinogen dalam urin dan memecahkan batu ginjal serta mencegah pembentukan batu ginjal kembali (kambuh).

Pada tabel 3, kelompok perlakuan 3 tidak berbeda nyata dengan kelompok kontrol positif dengan pemberian natrium nitrit selama 30 hari. Hal ini diduga bahwa pemberian EERJ dengan dosis 750 mg/kg BB dapat memberikan efek toksik pada ginjal. Genus pada tumbuhan *acorus* terkenal dengan melimpahnya kandungan  $\alpha$ -asarone dan  $\beta$ -asarone (Uebel dkk, 2021). Mukherjee dkk., (2007) melaporkan bahwa kandungan utama pada rimpang jeringau (*Acorus calamus* L.) berdasarkan hasil analisis kandungan minyak rimpang jeringau memiliki  $\beta$ -asarone (79,54%) dan  $\alpha$ -asarone (8,47%). kandungan  $\alpha$ -asarone dan  $\beta$ -asarone pada jeringau (*Acorus calamus* L.) jika di konsumsi dalam dosis berlebih akan mengakibatkan muntah berkepanjangan, halusinasi, karsinogenik dan genotoksik (Imam dkk., 2013). Beberapa penelitian telah

dilakukan pada *Acorus calamus* L. mengenai efek toksisitasnya, namun belum ditemukan adanya data yang pasti terkait dosis toksik dari *Acorus calamus* L.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian EERJ tidak berpengaruh terhadap morfologi ginjal tikus meliputi warna, bentuk dan konsistensi. Pemberian EERJ berpengaruh terhadap diameter histologi tubulus distal dan tubulus proksimal. Pemberian EERJ berpengaruh terhadap skor rata-rata derajat kerusakan histologis ginjal. Pemberian EERJ dengan dosis 250 mg/kg BB merupakan dosis yang aman dan optimal untuk memperbaiki kerusakan jaringan ginjal pasca induksi natrium nitrit. Saran dari hasil penelitian ini perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh natrium nitrit terhadap ginjal dengan dosis yang lebih tinggi dan dengan jangka waktu yang lama untuk mengetahui pengaruh toksisitas natrium nitrit sampai tahap morfologi ginjal. dan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai dosis toksik (*lethal dose*) ekstrak rimpang jeringau untuk keamanan terapi.

## Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu kelancaran penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aita, N. A. A., & Mohammed, F. F. (2014). Effect of Marjoram Oil on the Clinicopathological, Cytogenetic and Histopathological Alterations Induced by Sodium Nitrite Toxicity in Rats. *Global Veterinaria*, 12(5), 606–616.
- Aliza, D., W., & Sipahutar, L. W. (2013). Efek Peningkatan Suhu Air Terhadap Perubahan Perilaku, Patologi Anatomi, Dan Histopatologi Insang Ikan Nila (*Oreochromis Niloticus*). *Jurnal Medika Veterinaria*, 7(2), 143–145.
- Anggraini, DR. (2008). *Gambaran Miskroskopis Dan Miskroskopis Hati Ginjal Mencit Akibat Pemberian Plumbum Asetat*. (Thesis).[medan (Indonesia)] USU.
- Ansari, F. A., Ali, S. N., Arif, H., Khan, A. A., & Mahmood, R. (2017). Acute oral dose of sodium nitrite induces redox imbalance, DNA damage, metabolic and histological changes in rat intestine. *PLoS ONE*, 12(4), 1–22.
- Back, J. H., Zhang, X., Williams, M. C., Hicks, W., Buehler, P. W., & D'Agnillo, F. (2015). Sodium nitrite potentiates renal oxidative stress and injury in hemoglobin exposed guinea pigs. *Toxicology*, 333, 89–99.
- Barua, C, Sen S, Das AS, Talukdar A, Hazarika NJ, Gohain Barua A, Baruah AM, Barua I. (2014). A comparative study of the in vitro antioxidant property of different extracts of *Acorus calamus* Linn. *J Nat Prod Plant Resour*. 4(1):8–18
- Brachemi, S. (2014). Renal biopsy practice: What is the gold standard? *World Journal of Nephrology*, 3(4), 287.
- Campos, ES, Valdez-Solana MA, Campos-Almazán MI, Avitia-Domínguez C, Hernández-Rivera JL, de Lira-Sánchez JA, García-Arenas G, Téllez-Valencia A. (2018). Nitrate and nitrite in drinking water affect antioxidant enzymes in erythrocytes of rats. *Ukr Biochem J*. 90(4):90–101.
- Dewi, I. A. R. P., Wiratmini, N. I., & Setyawati, I. (2020). Hepatoprotektor Rumput Laut *Eucheuma cottonii* Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus* L.) Jantan Yang Diinduksi Natrium Nitrit (Nano2). *Metamorfosa: Journal of Biological Sciences*, 7(2), 86.
- Duarte, J., Jiménez, R., O'Valle, F., Galisteo, M., Pérez-Palencia, R., Vargas, F., Tamargo, J. (2002). Protective effects of the flavonoid quercetin in chronic nitric oxide deficient rats. *Journal of Hypertension*, 20(9), 1843–1854.
- EL Barky, A. R., Mohamed, T. M., & Ali, E. M. M. (2020). Detoxifying and antioxidant effect of ellagic acid nano particles in rats intoxicated with sodium nitrites. *Applied Biological Chemistry*, 63(1).
- Elsabagh, R. A. (2016). Protective Effects of Ascorbic Acid and Garlic Oil against Toxic Effects induced by Sodium Nitrite as Meat Additive in Male Rats. *Global Veterinaria*. 16 (6): 508-524.
- Fahrianti, N., Lyrawati, D., & Sarwono, I. (2015). Efek Asam Alfa Lipoat pada Kadar MDA dan Histologi Ginjal Tikus Wistar Diabetes Melitus Tipe 1 Effect of Alpha Lipoic Acid on MDA Levels and Histology of Wistar Rats ' Kidney Type 1 Diabetes Mellitus. *Jurnal Kedokteran Bravijaya*, 28(3), 177–181.
- Ghelani, H., Chapala, M., & Jadav, P. (2016). Diuretic and antiurolithiatic activities of an ethanolic extract of *Acorus calamus* L. rhizome in experimental animal models. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 6(4), 431–436.
- Guyton, A. C., dan Hall, J. E. (2007). *Buku ajar fisiologi kedokteran edisi 11*. Jakarta: EGC. Hal 118-125

- Ibrahim AAE, Abd HM, Latief E. (2020). The Therapeutic Effect of Mesenchymal Stem cells on kidney and inos Expression in Hypoxic Male Rats. *Ciência e Técnica Vitivinícola*. 32(10): 168-182.
- Imam, H., Riaz, Z., Azhar, M., Sofi, G., & Hussain, A. (2013). Sweet flag (*Acorus calamus* Linn.): An incredible medicinal herb. *International Journal of Green Pharmacy*, 7(4), 288–296.
- Ismail, A. E.-T. M., Moustafa, A. M., & Abd El-Rhman B., G. (2003). Microscopic Studies Of The Effect Of Some Food Additives On The Kidney Of Albino Rat. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, 12(1), 12–27.
- JECFA.(Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), (2002). Evaluation of certain food additives and contaminants. Fifty-ninth report of JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Technical Reports Series No. 913, pp. 20–32. Available online:[http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TR\\_S\\_913.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TR_S_913.pdf). Dikutip tanggal 9 April 2022.
- Kotyk T, Dey N, Ashour AS, Balas-timar D, Chakraborty S. (2016). Measurement Of Glomerulus Diameter And Bowman's Space Width Of Renal Albino Rats. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*. 126 (2016): 143-153.
- Krishnamoorthy, P., & Sangeetha, M. (2008). Hepatoprotective effect of vitamin C on sodium Nitrite-Induced lipid peroxidation in albino rats. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 45(3), 206–208.
- Kumar Abbas, Abul K., Fausto, Nelson., Robbins, Stanley L., Cotran, Ramzi S., MD Consult LLC., V. (2005). *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. Philadelphia (Netherlands): Elsevier Saunders. Hal 920
- Li, S., Liu, X., Chen, X., & Bi, L. (2020). Research Progress on Anti-Inflammatory Effects and Mechanisms of Alkaloids from Chinese Medical Herbs. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020.
- Liaudet, L., Rosenblatt-Velin, N., & Pacher, P. (2013). Role of Peroxynitrite in the Cardiovascular Dysfunction of Septic Shock. *Current Vascular Pharmacology*, 11(2), 196–207.
- Lin, X., Jiang, C., Luo, Z., & Qu, S. (2013). Protective effect of Erythropoietin on renal injury induced in rats by four weeks of exhaustive exercise. *BMC Nephrology*, 14(1).
- Loying, R., Gogoi, R., Sarma, N., Borah, A., Munda, S., Pandey, S. K., & Lal, M. (2019). Chemical Compositions, In-vitro Antioxidant, Anti-microbial, Anti-inflammatory and Cytotoxic Activities of Essential Oil of *Acorus calamus* L. Rhizome from North-East India. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 22(5), 1299–1312.
- Mappa, I. S., Kairupan, C., & Loho, L. (2013). Gambaran Histologi Ginjal Tikus Putih (Wistar) Setelah Pemberian Rifampisin. *Jurnal E-Biomedik*, 1(1).
- Marieb EN, Hoehn KN. (2014), *Human Anatomy & Physiology, 10th Edition* | Pearson. (England):Pearson Education Limited.Hal 984-1014
- McCulloch, T., Prayle, A., Lunn, A., & Watson, A. R. (2011). Karyomegalic-like nephropathy, Ewing's sarcoma and ifosfamide therapy. *Pediatric Nephrology*, 26(7), 1163–1166.
- Monga, G., Banfi, G., Salvatore, M., Amatruda, O., Bozzola, C., & Mazzucco, G. (2006). Karyomegalic interstitial nephritis: report of 3 new cases and review of the literature. *Clinical Nephrology*, 65(5), 349-355.
- Muchtaromah, B., Ahmad, M., S, E. K., A, Y. M., & A, V. L. (2017). Phytochemicals, Antioxidant and Antifungal Properties of *Acorus calamus*, *Curcuma mangga*, and *Allium sativum*. *KnE Life Sciences*, 3(6), Hal 93.
- Mukherjee, P. K., Kumar, V., Mal, M., & Houghton, P. J. (2007). In vitro acetylcholinesterase inhibitory activity of the essential oil from *Acorus calamus* and its main constituents. *Planta Medica*, 73(3), 283–285.
- Nasir, O. (2021). Protective effect of *Acorus calamus* on kidney and liver functions in healthy mice. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(5), 2701–2708.
- Nath, P., Arun Kumar Yadav, & Amar Deep Soren. (2017). Sub-acute toxicity and genotoxicity assessment of the rhizome extract of *Acorus calamus* L., A medicinal plant of India. *Eur. J. Pharm. Med.*, (July), 392-399.
- Özen, H., Kamber, U., Karaman, M., Gül, S., Atakişi, E., Özcan, K., & Atakişi, O. (2014). Histopathologic, biochemical and genotoxic investigations on chronic sodium nitrite toxicity in mice. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 66 (8), 367–375.
- Parul, R., Kundu, S. K., & Saha, P. (2012). In Vitro Nitric Oxide Scavenging Activity Of Methanol Extracts Of Three Bangladeshi Medicinal Plants. *The Pharma Innovation-Journal*, 1(12), 83–88.
- Patel, P., Vaghasiya, J., Thakor, A., & Jariwala, J. (2012). Antihypertensive effect of rhizome part of *Acorus calamus* on renal artery occlusion induced



- hypertension in rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2(SUPPL.1), S6–S10.
- Pavlova, E., Dimova, D., Petrova, E., Gluhcheva, Y., & Atanassova, N. (2013). Changes in rat testis and sperm count after acute treatment with sodium nitrite. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 19(SUPPL. 2), 186–189.
- Radi, Z. A., Stewart, Z. S., Grzemski, F. A., & Bobrowski, W. F. (2013). Renal Pathophysiological Role of Cortical Tubular Inclusion Bodies. *Toxicologic Pathology*, 41(1), 32–37.
- Rani M, Souza DD. (2020). Detrimental Effects Of Sodium Nitrite On The Kidney Of Swiss Albino Mice. *International Journal of Research and Analytical Reviews*. 7(2): 158-163
- Rohman, J., Sunarno, & Isdadiyanto, S. (2021). )efek minuman berenergi terhadap histopatologis ginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*). *Media Bina Wilayah*, 15(7), 4835–4848.
- SCF. (Scientific Committee for Food) (1997). 1997. Reports of the Scientific Committee for Food (Thirty-eighth series). Opinions of the Scientific Committee for Food on: nitrates and nitrite. [Microsoft Word - 01cov38.doc \(europa.eu\)](#). Dikutip tanggal 9 April 2022.
- Sharma, V., Sharma, R., Gautam, D. N. S., Kuca, K., Nepovimova, E., & Martins, N. (2020). Role of vacha (*Acorus calamus* Linn.) in neurological and metabolic disorders: Evidence from ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacology and clinical study. *Journal of Clinical Medicine*, 9(4).
- Singh, D. K., Kumar, N., Sachan, A., Lakhani, P., Tutu, S., Shankar, P., Dixit, R. K. (2017). An experimental study to see the antihypertensive effects of gymnema sylvestre and acorus calamus in wistar rats and its comparison with amlodipine. *Asian Journal of Medical Sciences*, 8(3), 11–15.
- Sipahutar, L. W., Aliza, D., -, W., & -, N. (2013). gambaran histopatologi insang ikan nila (*oreochromis niloticus*) yang dipelihara dalam temperatur air di atas normal. *Jurnal Medika Veterinaria*, 7(1), 2000–2002.
- Suhita N. L. P. R., Sudira, I. W., & Winaya, I. B. O. (2013). Histopatologi ginjal tikus putih akibat pemberian ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) peroral. *Buletin Veteriner Udayana*, 5(1), 63-69.
- Sun, D., Ma, Y., Han, H., Yin, Z., Liu, C., Feng, J., Yu, R. (2012). Thrombospondin-1 short hairpin RNA suppresses tubulointerstitial fibrosis in the kidney of ureteral obstruction by ameliorating peritubular capillary injury. *Kidney and Blood Pressure Research*, 35(1), 35–47.
- Suparmi, S., Fasitasari, M., Martosupono, M., & Mangimbulude, J. C. (2016). Comparisons of Curative Effects of Chlorophyll from *Sauropus androgynus* (L) Merr Leaf Extract and Cu-Chlorophyllin on Sodium Nitrate-Induced Oxidative Stress in Rats. *Journal of Toxicology*, 2016.
- Suryaningrum K, Widyaningsih W. 2012. Antiangiogenic Effects Of Water Fraction Of Green Algae (*Spirogyra* Sp.) Ethanol Extract With Chorio Allantoic Membrane Method. In *Proceeding of International Conference on Drug Development of Natural Resources June 30th* (p. 85).
- Tripatara, P., Patel, N. S. A., Webb, A., Rathod, K., Lecomte, F. M. J., Mazzon, E., ... Thiemermann, C. (2007). Nitrite-derived nitric oxide protects the rat kidney against ischemia/reperfusion injury in vivo: Role for xanthine oxidoreductase. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(2), 570–580.
- Uebel, T., Hermes, L., Haupenthal, S., Müller, L., & Esselen, M. (2021).  $\alpha$ -Asarone,  $\beta$ -asarone, and  $\gamma$ -asarone: Current status of toxicological evaluation. *Journal of Applied Toxicology*, 41(8).
- Vishnoi, H., Bodla, R., Kant, R., & Bodla, R. B. (2018). Green Tea (*Camellia Sinensis*) and Its Antioxidant Property: a Review. *Article in International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 9(5), 1723.
- Wahyuningsih, S. P. A., Atika, B. N. D., Sajidah, E. S., & Winarni, D. (2020). Nephroprotective activity of okra pods extract (*Abelmoschus esculentus* l.) in sodium nitrite-induced mice. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 13(8), 3648–3652.
- Wahyuningsih, S. P. A., Fachrisa, A., Nisa, N., Kusuma, B. W. A., Shoukat, N., Ahmar, R. F., & Alifiyah, N. I. (2021). Potential of Red Okra Extract (*Abelmoschus esculentus* L. Moench) to Restore Kidney Damage due to Sodium Nitrite. *Biosaintifika: Journal of Biology and Biology Education*, 13(1), 84–91.
- Wang, J., Wang, D., Li, Y., Zuo, H., Wang, S., Xu, X., Peng, R. (2013). Rhabdomyolysis-induced acute kidney injury under hypoxia and deprivation of food and water. *Kidney and Blood Pressure Research*, 37(4–5), 414–421.
- Yadav, D., Srivastava, S., & Tripathi, Y. B. (2019). *Acorus Calamus* A Review. *International Journal of Scientific Research in Biological Sciences*, 6(4), 62–67.
- Zaidi, Z. F. (2010). Sodium nitrite-induced hypoxic injury in rat hippocampus. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 26(3), 532–537.