

Research Article

EFEK EKSTRAK ETANOL DAUN GEDI MERAH (*Abelmoschus manihot* L.) TERHADAP GAMBARAN HISTOLOGI GINJAL TIKUS PUTIH JANTAN (*Rattus norvegicus*) MODEL UROLITHIASIS

IRMA SANTI, RAHMAWATI, LILI TARI

Laboratorium Farmakologi, Fakultas Farmasi, Universitas Muslim Indonesia, Makassar

ABSTRACT

Urolithiasis or kidney stones is a disease caused by urine sediment in the urinary tract. It can be observed histologically by investigating the presence of crystals and tissue damage such as degeneration hydropis, hemorrhage, and necrosis. The aim of this reseach is to prove the effect of ethanol extract of red gedi leaves (*Abelmoschus manihot* L) on histological of white rat kidney (*Rattus norvegicus*) urolithiasis model. This reseach used 15 rat devided into 5 groups. Group 1 was the normal group; group 2 was induced by ethylene glycol 0,75% and ammonium chloride 1 %; group 3,4 and 5 were a test group induced by ammonium chloride 1 %; group 3,4 and 5 were a test ammonium chloride 0.75 % and 1 % and ethanol extract of red gedi leaves with succesive doses of 10 mg/kgBW, 20 mg/kgBW, 40 mg/kgBW. The data were analyzed statistically using Kruskal wallis test and Mann-Whitney's advanced test. The result showed that the group of red gedi leaf extract with doses 40 mg/kgBW statically has the best effect as antiurolithiasis on the white rats. As conclusion, extract of red gedi leaves can be used to urolithiasis.

Keywords : Urolithiasis, red gedi, *Abelmoschus manihot* L

ABSTRAK

Urolithiasis atau batu ginjal merupakan penyakit yang disebabkan oleh adanya sedimen urin dalam saluran kemih. Penyakit ini dapat diamati secara histologi dengan melihat adanya kristal dan kerusakan jaringan seperti degenerasi hidropis, hemorrhage, dan nekrosis. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh pemberian ekstrak etanol daun gedi merah (*Abelmoschus manihot* L.) terhadap gambaran histologi ginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*) model urolithiasis. Penelitian ini menggunakan 15 ekor tikus yang dibagi menjadi 5 kelompok. Kelompok 1 merupakan kelompok normal, kelompok 2 diinduksi etilen glikol 0,75% dan ammonium klorida 1%, kelompok 3, 4, dan 5 merupakan kelompok uji yang diinduksi ammonium klorida 0,75% dan ammonium klorida 1% dan ekstrak etanol daun gedi merah masing-masing dengan dosis berturut-turut 10 mg/kgBB, 20mg/kgBB, dan 40mg/kgBB. Data hasil penelitian dianalisis secara statistik menggunakan uji Kruskal wallis dan uji lanjutan Mann-Whitney. Hasil analisis menunjukkan bahwa kelompok ekstrak daun gedi merah dosis 40 mg/KgBB secara statistik memiliki efek yang paling baik sebagai antiurolithiasis pada tikus putih (*Rattus norvegicus*). Sebagai kesimpulan, ekstrak daun gedi merah dapat digunakan sebagai pengobatan urolithiasis

Kata kunci: Urolithiasis, Gedi Merah, *Abelmoschus manihot* L

Correspondence : Irma santi, Laboratorium Farmakologi, Fakultas Farmasi, Universitas Muslim Indonesia, Makassar. **Email** : irma.santi@umi.ac.id

PENDAHULUAN

Urolithiasis atau batu ginjal merupakan gejala penyakit yang disebabkan oleh adanya sedimen urin dalam saluran kemih. *Urolithiasis* dapat disebabkan oleh *hiperkalsiuria*, dehidrasi, kurang minum, adanya riwayat *gout* dan infeksi [1,2]. Kristal kalsium oksalat dan kadar oksalat yang tinggi dalam nefron menyebabkan kerusakan dalam sel epitel dan konsekuensinya sel menghasilkan beberapa produk seperti radikal bebas yang menginduksi terbentuknya kristal nukleat heterogen dan menyebabkan agregasi Kristal [2].

Urolitiasis merupakan penyakit ketiga paling umum di dunia pada saluran perkemihan dengan prevalensi diperkirakan terjadi pada 2-5% di Asia, 8-15% di Eropa dan Amerika dan sekitar 20% di Timur Tengah, serta memiliki tingkat kekambuhan yang tinggi, yaitu sekitar 10-23% per tahun, 50% dalam 5-10 tahun dan 75% dalam 20 tahun. Sedangkan prevalensi batu ginjal di Indonesia tahun 2002 berdasarkan data yang dikumpulkan dari rumah sakit di seluruh Indonesia adalah sebesar 37.636 kasus baru, dengan jumlah kunjungan sebesar 58.959 orang, dengan jumlah kematian adalah sebesar 378 orang [3,4].

Pengobatan *urolithiasis* biasanya menggunakan teknik-teknik pembedahan seperti *shockwave*, *lithotripsy*, *ureteroscopy*, dan ekstraksi batu perkutan dimana teknik-teknik ini memiliki kerugian seperti cedera ginjal dan pembentukan batu kembali sebesar 50% di atas 10 tahun [5]. Maka dari itu pengobatan secara tradisional menggunakan bahan alam sangat dianjurkan karena pengobatan ini mempunyai efek samping yang lebih kecil dibandingkan penggunaan pengobatan kimiawi

Salah satu tumbuhan yang berpotensi sebagai obat adalah gedi merah. Secara umum gedi merah mengandung senyawa golongan flavonoid (*Myrecetin*, *Myricetin* 3-O-beta-D-glucopyranoside, *Quercetin*, dan *glucuronida*) dan steroid (*Stigmasterol* dan γ -*Sitosterol*). Diketahui pula daun gedi yang diekstraksi dengan etanol 96% memiliki total flavonoid sebesar 41,56% [6,7].

Berdasarkan penelitian yang dilakukan Wientarsih (2012), didapatkan bahwa ekstrak daun alpukat (*Persea americana* Mill) yang memiliki kadar flavonoid yang tinggi secara signifikan dapat menurunkan kadar kalsium dan memiliki aktivitas inhibitor terhadap pembentukan kristal kalsium oksalat. Flavonoid dapat mencegah adhesi dari kristal kalsium oksalat melalui efek *scavenger* dimana dapat mencegah kerusakan ginjal akibat terbentuknya radikal bebas sehingga menghasilkan radikal yang lebih stabil. Selain itu flavonoid juga memecah kalsium oksalat dengan cara berikatan dengan kalsium membentuk senyawa kompleks Ca-flavonoid. Senyawa kompleks tersebut bersifat mudah larut dalam air sehingga kristal dengan mudah akan larut dalam urin [2,8].

Histologi merupakan salah satu parameter yang dapat digunakan untuk melihat keadaan ginjal. Pada penelitian yang dilakukan oleh Sartono (2014) menggunakan histologi sebagai parameternya dengan melihat ada atau tidaknya kerusakan pada ginjal seperti adanya kristal, degenerasi hidropis, *edema*, degenerasi lemak, kongesti, *nekrosis*, peradangan, dan *hemorrhage*.

Pada penelitian ini akan dilihat khasiat ekstrak etanol daun gedi merah (*Abelmoschus manihot* L. Medik) dalam pengobatan penyakit

sistem saluran kemih dalam hal ini *urolithiasis* dengan melihat gambaran histologi ginjal tikus putih.

METODE PENELITIAN

a. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah seperangkat alat maserasi, kandang tikus, timbangan analitik, timbangan hewan, alat-alat gelas, seperangkat alat bedah dan seperangkat alat histologi. Bahan-bahan yang digunakan adalah daun gedi merah, etanol, Natrium Karboksimetilselulosa, etilen glikol 0,75%, ammonium klorida 1%, alkohol 100%, buffer formalin 10%, eter, pewarna Hematoxylin-Eosin, xylol dan aquadest.

b. Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus Novergicus*) strain wistar dengan kriteria sehat, bobot badan 180-250 gram, berusia 2 bulan.

c. Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental sesungguhnya (*True experimental*) dengan melihat keadaan ginjal berdasarkan pengamatan secara mikroskopik. Rancangan penelitian yang digunakan dengan menggunakan pendekatan *post test only control group design* [9]. Penelitian ini terdiri dari beberapa tahap yaitu tahap pembuatan ekstrak daun gedi merah, pembuatan sediaan induksi batu ginjal, perlakuan terhadap hewan uji, penyiapan preparat histologi dan pengamatan histologi ginjal.

1. Pembuatan Ekstrak Daun Gedi Merah

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Daun gedi merah kering yang telah dihaluskan,

ditimbang sebanyak 400 g dan dimasukkan ke dalam wadah untuk dimaserasi, kemudian ditambahkan etanol hingga terendam, dibiarkan selama 1 hari dalam bejana tertutup dan terlindung dari cahaya matahari sambil diaduk secara periodik, setelah itu simplisia disaring. Maserasi dilanjutkan kembali selama 2 hari dengan pelarut etanol yang baru, sambil diaduk secara periodik, kemudian disaring. Ekstrak tersebut kemudian diuapkan dengan *Rotary vacuum evaporator* dan didapatkan ekstrak etanol kental. Kemudian dikeringkan kembali hingga didapatkan ekstrak kering.

2. Pembuatan Sediaan Induksi Batu Ginjal

Bahan yang digunakan untuk membentuk batu ginjal pada tikus adalah etilen glikol 0,75% (v/v) serta amonium klorida 1% (b/v) yang digunakan untuk mempercepat proses pembentukan batu ginjal [10]. Larutan induksi dibuat sebanyak 1000 mL, dimana sebanyak 7,5 mL etilen glikol dilarutkan dengan sedikit aquadest, kemudian dicampur dengan ammonium klorida sebanyak 10 g yang telah dilarutkan dengan sedikit aquadest. Kemudian campuran tersebut ditambahkan aquadest hingga 1000 mL. Volume yang diberikan kepada hewan uji sebanyak 12 mL/200 g BB/hari.

3. Perlakuan Terhadap Hewan Uji

15 ekor tikus dibagi dalam lima kelompok dan diberi perlakuan yang berbeda. Kelompok 1 (normal), kelompok 2 (kontrol negatif), kelompok 3, 4 dan 5 diberi ekstrak daun gedi merah masing-masing dengan dosis 10 mg/kg BB, 20 mg/kg BB, dan 40 mg/kg BB. Setelah itu semua kelompok di induksi dengan pemberian etilen glikol 0,75% dan ammonium klorida 1% selama 7

hari, kecuali kelompok normal. Selanjutnya diberikan perlakuan terapi dengan menggunakan ekstrak etanol daun gedi merah (*Abelmoschus manihot* L.) pada kelompok 3, 4, dan 5 yang diberikan secara oral selama 6 hari. Pada hari ketujuh semua hewan uji dilakukan pembedahan.

4. Penyiapan Preparat Histologi

Hewan uji dilakukan euthanasi dan dibedah untuk diambil organ ginjalnya. Ginjal yang sudah diambil, kemudian direndam ke dalam larutan formalin 10%. Kemudian pembuatan preparat histotologi terdiri dari [11] :

- a) Fiksasi (*fixation*): Jaringan difiksasi dengan *buffer* formalin 10 % pada pH 7,0-7,4 selama 12-18 jam.
- b) Dehidrasi (*dehydration*): Jaringan dimasukkan ke dalam etanol dengan konsentrasi yang makin meningkat yaitu etanol 70%, etanol 90%, etanol 95%, dan etanol 100%.
- c) Pembeningan (*Clearing*): Jaringan dimasukkan ke dalam xylol I selama 1 jam selanjutnya dimasukkan ke dalam xylol II lalu diinkubasi selama ½-1 jam.
- d) Pembenaman (*embedding/impregnasi*): Jaringan dimasukkan dalam parafin dengan suhu lebur rendah kira-kira 56 - 59 °C selama ½ jam.
- e) Pemblokkan (*blocking*): Pembuatan blok parafin
- f) Pemotongan dan perekatan (*sectioning and Mounting*) dengan tahap - tahap sebagai berikut:
 - I. Blok parafin yang mengandung preparat direkatkan pada tempatnya di mikrotom.

- II. Pisau mikrotom diletakkan di tempatnya dengan sudut kemiringan 20-30° selanjutnya preparat dipotong dengan ketebalan antara 4 - 6 µm dengan cara pemotongan secara teratur dan ritmis, jaringan dipotong secara melintang.
- III. Pita-pita parafin yang awal tanpa jaringan dibuang sehingga didapatkan potongan yang mengandung preparat jaringan.
- IV. Pita yang mengandung jaringan kemudian dipindahkan dengan kuas yang telah dibasahi air diletakkan pada permukaan *waterbath* suhu 37 - 40 °C, dibiarkan beberapa saat sampai pita tersebut mengembang.
- V. Selanjutnya kaca objek yang telah disalut dengan poly L- lisine dimasukkan ke dalam *waterbath* dan menggerakkannya ke arah pita parafin dengan menggunakan kuas ditempelkan pada kaca objek, setelah melekat kaca objek

Kaca objek dikeringkan pada suhu kamar selanjutnya diletakkan di dalam oven selama 3 jam sampai dengan satu malam. Setelah slide kering selanjutnya dilakukan tahap histotologi sebagai berikut :

- a. Deparinisasi : preparat/ *slide* direndam dalam larutan xylol I, II dan III dalam *chamber* masing-masing selama 5 menit lalu dilakukan rehidrasi menggunakan etanol dengan konsentrasi menurun dari etanol 100%, 95% , 80 % selama masing-masing 3 menit, selanjutnya dicuci dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit.
- b. *Counter staining*: Direndam *slide* dalam *chamber* berisi larutan Hematoxylin-Eosin

(HE) biarkan 3 menit kemudian dicuci dengan air mengalir.

- c. *Clearing* : Dihilangkan air sekitar *slide* lalu dehidrasi menurun dengan etanol 80, 95%, 100% selama masing-masing 5 menit selanjutnya di rendam dalam xilol I,II,III selama masing-masing 5 menit.
- a. *Mounting* : Ditetesi *counter glass* pada kedua sisinya kemudian direkatkan. Hindari jangan sampai *slide* kering dan ada gelembung.
- b. Diinkubasi pada suhu kamar selama ± 1 minggu.

5. Pengamatan Histologi Ginjal

Setelah semua tahap dilakukan, preparat lalu dapat diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya dilengkapi kamera digital dengan pembesaran 100 atau 400x. Pemberian skor pada kerusakan jaringan ginjal merujuk pada penelitian Sartono (2014) yaitu, skor 0 (normal), skor 1 (degenerasi hidropis), skor 2 (degenerasi lemak dan piknosis), skor 3 (nekrosis dan hemorrhage).

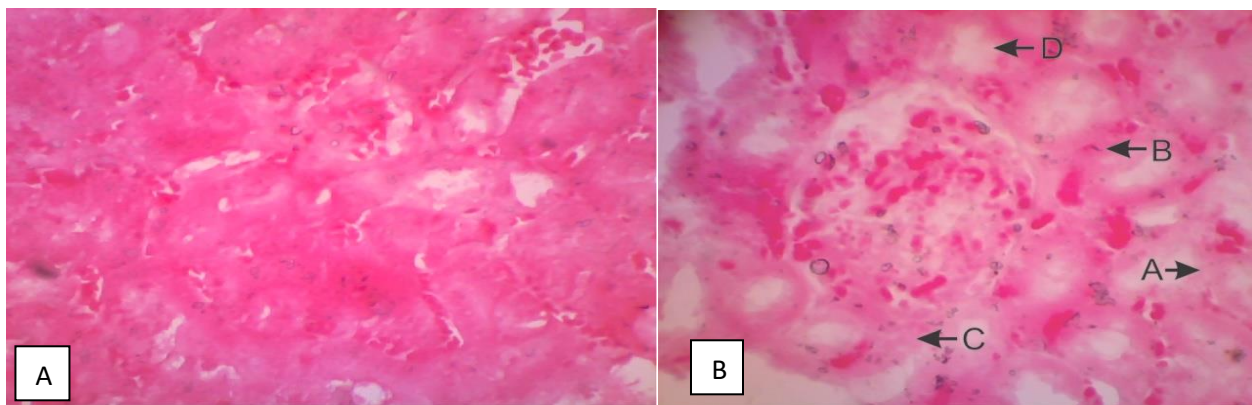
Data yang diperoleh diolah dan dianalisis dengan uji *Kruskall Wallis* dilanjutkan dengan uji Mann-witney dengan taraf signifikansi $\alpha=0,05$

HASIL

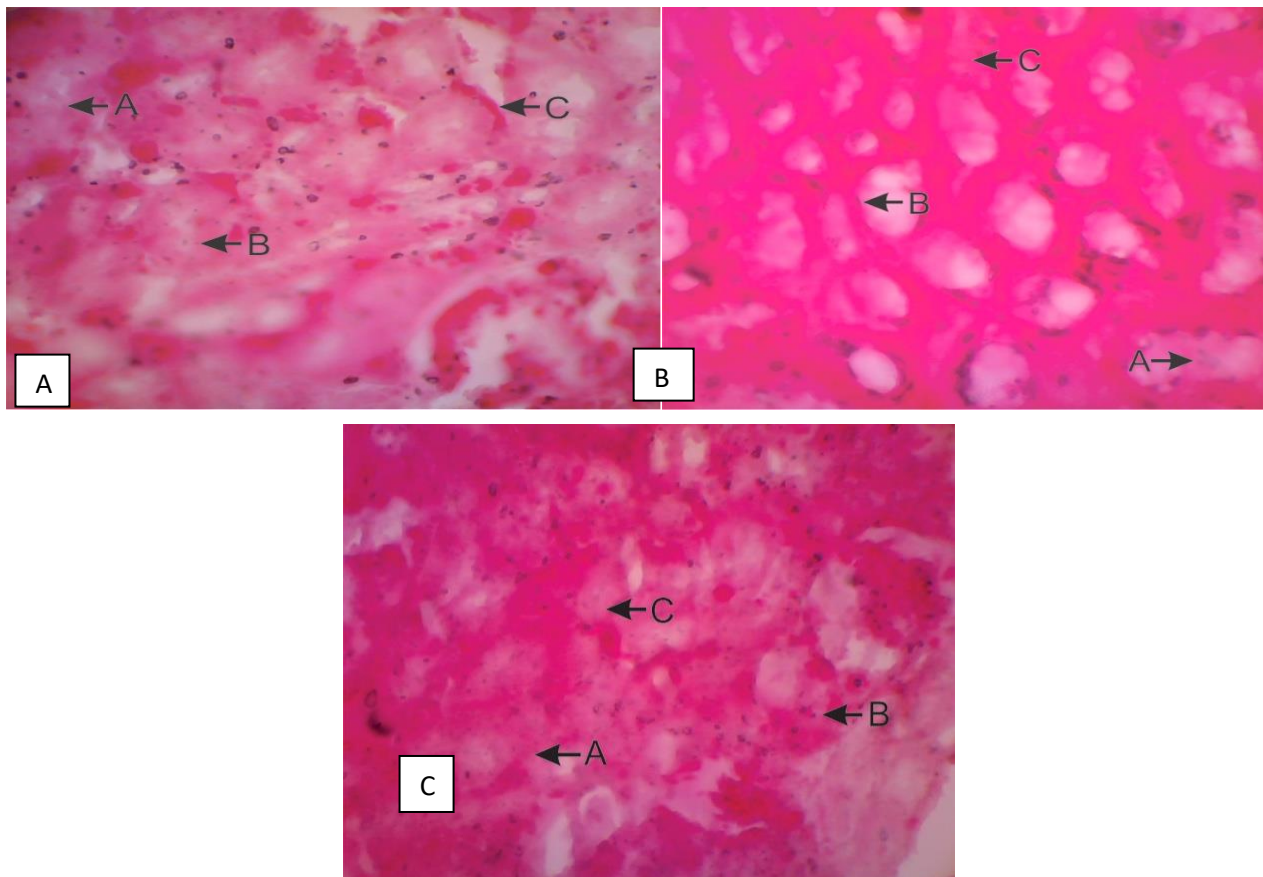
Pada penelitian ini didapatkan hasil skor kerusakan ginjal pada tabel 1. Hasil pengamatan histologi ginjal pada penelitian ini diamati secara mikroskopis dengan perbesaran 400x.

Kelompok Perlakuan	Skor Kerusakan	Sig(α)
kelompok I (normal)	2,3	0,046
Kelompok II (negatif)	5,6	0,05
Kelompok III (EEDGM 10 mg/kgBB)	4,7	0,275
Kelompok III (EEDGM 20 mg/kgBB)	4,4	0,127
Kelompok III (EEDGM 40 mg/kgBB)	3,7	0,127

Tabel 1. Rata-rata hasil skor kerusakan ginjal tikus



Gambar 1. Histologi ginjal kelompok normal (A) dan kelompok negatif (B)
Perbesaran 400x) A: Degenerasi Hidropis, B: Piknosis, C: Nekrosis D: Kristal



Gambar 2. Histologi ginjal kelompok Ekstrak daun gedi merah 10 mg/KgBB
(A) dan kelompok Ekstrak daun gedi merah 20 mg/KgBB
(B) Ekstrak daun gedi merah 40 mg/KgBB (C)
Perbesaran 400x) A: Degenerasi Hidropis, B: Piknosis, C: Nekrosis

PEMBAHASAN

Urolithiasis atau yang lebih dikenal sebagai batu ginjal merupakan gangguan yang diakibatkan oleh terbentuknya padatan seperti batu pada ginjal maupun saluran kemih. Diperkirakan 80% batu ginjal tersusun dari kalsium oksalat. Kristal kalsium oksalat dan kadar oksalat yang tinggi dalam nefron menyebabkan kerusakan dalam sel epitel dan konsekuensinya sel menghasilkan beberapa produk seperti radikal bebas yang menginduksi terbentuknya kristal nukleat heterogen dan menyebabkan agregasi kristal. Dalam banyak kasus gangguan ini dapat menyebabkan rasa yang tidak nyaman, serta penurunan fungsi ginjal [2].

Pemberian etilen glikol dapat meningkatkan aktifitas enzim sintesis oksalat seperti *Glycolic Acid Oxidase* (GAO) yang diproduksi di hati dan *Lactate Dehydrogenase* (LDH) yang diproduksi di hati dan ginjal sehingga menyebabkan hiperoksaluria. Ammonium klorida adalah yang paling sering dikombinasikan dengan Etilen glikol secara oral untuk menghasilkan deposit dari kristal kalsium oksalat pada ginjal tikus [8,10]. Pada penelitian ini, parameter yang digunakan untuk mengamati keadaan ginjal yaitu gambaran histologi. Dalam parameter ini dapat diamati kerusakan-kerusakan seperti adanya kristal, degenerasi hidropis, *edema*, degenerasi lemak, kongesti, *nekrosis*, peradangan, dan *hemorrhage* [8].

Dari hasil penelitian yang dapat dilihat pada tabel 1 menunjukkan adanya perbedaan skor kerusakan ginjal antara tiap kelompok perlakuan. Skor kerusakan tertinggi pada semua kelompok perlakuan terdapat pada kelompok kontrol negatif yaitu sebesar 5,6. Skor kerusakan ginjal terendah pada semua kelompok perlakuan terdapat pada

kelompok normal yaitu sebesar 2,3. Diantara semua kelompok ekstrak daun gedi merah, kelompok yang diberi ekstrak daun gedi merah 40 mg/KgBB memiliki skor kerusakan terendah yaitu sebesar 3,7.

Hasil pengamatan secara mikroskopik pada ginjal tikus menunjukkan bahwa kelompok normal tidak terdapat kerusakan sel. Pada kelompok kontrol negatif yang diinduksikan etilen glikol 0,75% dan ammonium klorida 1% menunjukkan adanya endapan kristal dan kerusakan sel-sel pada tubulus ginjal. Pada semua kelompok ekstrak etanol daun gedi merah menunjukkan adanya perbaikan kondisi tubulus ginjal yang ditandai dengan berkurangnya kerusakan sel-sel epitel dan tidak adanya endapan kristal.

Dari hasil pengamatan didapatkan pada kelompok kontrol negatif dan semua kelompok ekstrak terjadi degenerasi hidropis dan nekrosis. Pada degenerasi hidropis terjadi pembengkakan pada sitoplasma yang disebabkan adanya akumulasi cairan yang berlebih akibat gagal mempertahankan homeostasis dan regulasi cairan dalam sel, sedangkan nekrosis terjadi akibat adanya degenerasi sel yang berkelanjutan. Selain itu kerusakan lain yang terjadi pada beberapa kelompok yaitu *hemorrhage* yang terjadi akibat trauma pada sel epitel akibat kristal dapat dilihat pada kelompok kontrol negatif dan beberapa kelompok ekstrak kerusakan yang terjadi lainnya yaitu piknosis atau pengerutan inti sel yang ditandai dengan inti sel mengecil, membulat padat dan berwarna lebih gelap [8,12].

Data hasil *skoring* dianalisis secara statistik menggunakan uji *Kruskal Wallis* didapatkan nilai signifikansi dibawah 0,05 ($p=0,016$) yang menunjukkan terdapat perbedaan

antar kelompok perlakuan. Untuk mengetahui perbedaan tersebut maka dilakukan pengujian lanjutan menggunakan uji *Mann-Whitney*. Hasil uji tersebut menunjukkan kelompok kontrol negatif berbeda nyata dengan semua kelompok ekstrak etanol daun gedi merah yang menandakan semua kelompok ekstrak memberikan efek terhadap hewan uji. Perbandingan antar kelompok normal berbeda nyata dengan semua kelompok ekstrak etanol daun gedi merah yang artinya kelompok ekstrak yang memberikan efek perbaikan gambaran histologi tidak sampai pada kondisi normal/ awal. Perbandingan antara kelompok ekstrak daun gedi merah dosis 10 mg/kgBB, dosis 20 mg/kgBB dan dosis 40 mg/kgBB tidak berbeda nyata secara statistik yang menandakan semua kelompok ekstrak daun gedi merah memberikan efek perbaikan gambaran histologi yang sama.

Berdasarkan hasil skoring, ekstrak dosis 40 mg/kgBB menunjukkan perbaikan gambaran histologi yang paling baik. Hal ini disebabkan karena adanya kandungan flavonoid pada ekstrak daun gedi merah (*Abelmoschus manihot* L.) yang berkhasiat dalam pengobatan *urolithiasis*. Senyawa flavonoid ini dapat mencegah adesi dari kristal kalsium oksalat melalui efek *scavenger* yang dapat mencegah kerusakan ginjal akibat terbentuknya radikal bebas, dan menghasilkan radikal yang lebih stabil. Selain itu flavonoid juga memecah kalsium oksalat dengan cara berikatan dengan kalsium membentuk senyawa kompleks Ca-flavonoid [2,8]. Senyawa kompleks tersebut bersifat mudah larut dalam air sehingga kristal dengan mudah akan larut dalam urin.

KESIMPULAN

Hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Ekstrak etanol daun gedi merah (*Abelmoschus manihot* L.) dengan dosis 10 mg/kgBB, 20 mg/kgBB dan 40 mg/kgBB memiliki efek *antiurolithiasis* pada tikus putih (*Rattus norvegicus*).
2. Dosis ekstrak etanol daun gedi merah 40 mg/kgBB memiliki efek yang paling baik sebagai *antiurolithiasis* pada tikus putih (*Rattus norvegicus*).

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terima kasih kepada asisten laboran yang telah ikut membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.

PENDANAAN

Penelitian ini tidak didanai oleh sumber hibah manapun

KONFLIK KEPENTINGAN

Seluruh penulis menyatakan tidak terdapat potensi konflik kepentingan dengan penelitian, kepenulisan (*authorship*), dan atau publikasi artikel ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Grace, P.A., & Borley, N.R. 2006. At A Glance Ilmu Bedah. Edisi ketiga. Erlangga press, Jakarta. Hal 56-57
2. Wientarsih I, Madyastuti R, Prasetyo B, Aldobrata A., 2012. Anti Lithiasis Activity of Avocado (*Persea americana* Mill) Leaves Extract in White Male Rats. Hayati Journal of Biosciences, 19:49-52.
3. Rully MA., 2010. Batu Staghorn Pada Wanita: Faktor Resiko dan Tatalaksananya, Jurnal Ilmiah Mahasiswa Kedokteran Indonesia, 1: 52-58.

4. Khan A, Bashir S, Khan SR, Gilani AH., 2011. Antiuro lithic activity of *Origanum vulgare* is mediated through multiple pathways. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11:96
5. Sasikumar P, Gomathi S, Kolandaswamy A, Abishek A, Paul E, Vasudevan V, Sasikumar S, Selvam, G., 2014. Recombinant *Lactobacillus plantarum* expressing and secreting heterologous oxalate decarboxylase prevents renal calcium oxalate stone deposition in experimental rats. *Journal of Biomedical Science*, 21:86.
6. Todarwol A, Jain P, Bari S., 2011. *Abelmoschus manihot* Linn: ethnobotany, phytochemistry and pharmacology. *Asian Journal of Traditional Medicines*, 6 :1-7.
7. Pine ATD, Alam G, Attamimi F., 2011. Standarisasi mutu ekstrak daun gedi (*Abelmoschus manihot* L. Medik) dan uji efek antioksidan dengan metode DPPH. *Jurnal sains farmasi, UNHAS*, 2 : 34-35.
8. Sartono KM, Murwani S, Trisunuwati P., 2014. Efek Preventif Perasan Semanggi Air (*Marsilea Crenata*) Terhadap Gambaran Histopatologi Ginjal Dan Vesika Urinaria Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Model Urolithiasis, *Jurnal sains Universitas Brawijaya, Malang*, 2 : 45.
9. Zainuddin, M. 2011. Metodologi Penelitian: Kefarmasiaan dan Kesehatan. Erlangga press, Surabaya hal 10
10. Fan J, Glass MA, Chandhoke PS., 1999. Impact Of Ammonium Chloride Administration On A Rat Ethylene Glycol Urolithiasis Model, *Scanning Microscopy. Journal of Biomedical Science*, 22: 231.
11. Sudiana, K. 2005. Teknologi ilmu jaringan dan Imunohistokimia, Sagung seto, Jakarta.hal 54.
12. Putri DM, Busman H, dan Nurcahyani, N. 2013, Gambaran Histologis Tubulus Proksimal Ginjal Mencit (*Mus Musculus* L.) Jantan Yang Terpapar Kebisingan, Seminar Nasional Sains & Teknologi Lembaga Penelitian Universitas Lampung.