

EFEK PEMBERIAN KOMBUCHA BUNGA TELANG (*Clitoria ternatea*) TERHADAP KETEBALAN DINDING DAN LUAS AREA KOLAGEN AORTA MENCIT (*Mus musculus*)

Shabrina Adzhani, Aris Rosidah, Dini Sri Damayanti*
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

ABSTRAK

Pendahuluan: Kombucha merupakan minuman yang menjadi *trend* di kalangan masyarakat Indonesia. Kombucha memiliki kandungan senyawa bioaktif yang tinggi yang bermanfaat bagi kesehatan. Senyawa bioaktif ini diduga dapat menimbulkan efek toksik pada ginjal dan hepar yang dapat memengaruhi pembuluh darah. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah terdapat efek dari konsumsi kombucha bunga telang terhadap ketebalan dinding dan luas area kolagen aorta mencit.

Metode: Penelitian dilakukan secara *in vivo* selama 28 hari di laboratorium pada hewan coba mencit yang dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu kelompok normal (KN) yang diinduksi 1 cc, kelompok KBT dosis 1 (K1) yang diinduksi 25% sebanyak 1 cc, kelompok KBT dosis 2 (K2) yang diinduksi 50% sebanyak 1 cc, dan kelompok KBT dosis 3 (K3) yang diinduksi 100% sebanyak 1 cc (n=6 ekor). Selanjutnya mencit dilakukan pengorbanan dan diambil aorta untuk dibuat menjadi preparat histologi. Ketebalan dinding aorta diwarnai dengan pengecatan *Hematoxylin Eosin*, sedangkan luas area kolagen dengan pengecatan *Masson's Trichrome* lalu diamati dengan mikroskop trinokuler pada perbesaran 100x dan 400x dan dihitung dengan *ImageJ*. Analisa statistik menggunakan *One Way ANOVA* ($p<0,05$).

Hasil: Pemberian KBT dengan dosis I, II dan III tidak meningkatkan ketebalan dinding aorta ($p=0,197$) dan luas area kolagen ($p=0,202$) dibandingkan dengan kelompok normal

Simpulan: Pemberian kombucha bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) selama 28 hari dengan tiga konsentrasi dosis berbeda tidak memiliki pengaruh signifikan terhadap ketebalan dinding dan luas area kolagen aorta *Mus musculus* jantan.

Keywords: *Clitoria Ternatea L, Kombucha, Ketebalan Dinding Aorta, Luas Area Kolagen Aorta*

THE EFFECT OF BUTTERFLY PEA FLOWER (*Clitoria ternatea*) KOMBUCHA ON THE THICKNESS OF AORTIC WALL AND COLLAGEN AREA IN *Mus musculus*

Shabrina Adzhani, Aris Rosidah, Dini Sri Damayanti*
Medical faculty, Universitas Islam Malang

ABSTRACT

Introduction: Kombucha is a trendy beverage among the Indonesian community. Kombucha contains high levels of bioactive compounds that are beneficial for health. These bioactive compounds are suspected to have toxic effects on the kidneys and liver, which can affect blood vessels. The purpose of this study is to determine whether there are effects of consuming butterfly pea flower Kombucha on the thickness of the walls and the collagen area of the mouse aorta.

Methods: The research was conducted *in vivo* for 28 days in a laboratory using mice divided into four groups: the normal group (NG) induced with 1 cc, TFK dose 1 group (T1) induced with 25% at 1 cc, TFK dose 2 group (T2) induced with 50% at 1 cc, and TFK dose 3 group (T3) induced with 100% at 1 cc (n=6 mice per group). Subsequently, the mice were sacrificed, and the aorta was collected to create histological preparations. The thickness of the aortic wall was stained with Hematoxylin Eosin, while the collagen area was stained with Masson's Trichrome and observed under a trinocular microscope at 100x and 400x magnifications. The measurements were performed using *ImageJ*. Statistical analysis was conducted using *One Way ANOVA* ($p<0.05$).

Results: Administration of KBT at doses I, II, and III did not increase the thickness of the aortic wall ($p=0.197$) and the collagen area ($p=0.202$) compared to the normal group.

Conclusion: The administration of butterfly pea flower (*Clitoria ternatea* L.) kombucha for 28 days at three different concentration levels did not have a significant effect on the thickness of the aortic wall and collagen area in male *Mus musculus*.

Keywords: *Clitoria Ternatea L, Fermentation Drink, Aortic Wall Thickness, Collagen Area of the Aorta*

*Correspondence:

Dr. dr. Dini Sri Damayanti, M.Kes

JL. MT. Haryono 193 Malang, East Java, Indonesia, 65145

E-mail: dinisridamayanti@unisma.ac.id

PENDAHULUAN

Saat ini, banyak minuman yang menjadi *trend* di kalangan masyarakat Indonesia. Salah satunya adalah kombucha. Kombucha merupakan minuman dengan kandungan senyawa bioaktif yang tinggi, berasal dari bahan berupa tumbuhan (teh, ekstrak, simplisia bunga) dan aktivitas metabolik mikroorganisme (bakteri asam asetat, bakteri asam laktat, dan yeast), serta difermentasi oleh *Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast* (SCOBY) ⁴. Selain yeast, kombucha memiliki kandungan bakteri asam asetat (*Gluconacetobacter* dan *Acetobacter*) dan bakteri asam laktat (*Lactobacillus*). Hasil fermentasi dari kombucha akan menghasilkan asam laktat, asam asetat, dan etanol ⁴.

Penelitian yang dilakukan Yang *et al* (2023) menjelaskan bahwa *polyphenol-rich fermented foods* (PFFs) memiliki bioavailabilitas dan bioaktivitas yang lebih baik daripada *polyphenol-rich foods* yang tidak difermentasi karena polifenol digunakan sebagai substrat selama fermentasi dan dihidrolisis menjadi senyawa fenolik yang lebih kecil (seperti *quercetin*, *kaempferol*, *gallic acid*, *ellagic acid*, dan lain-lain) dengan bioaktivitas dan bioavailabilitas yang lebih tinggi melalui *polyphenol-associated enzymes* (PAEs). Sehingga kombucha memiliki kandungan antioksidan yang tinggi ².

Kandungan polifenol yang tinggi, etanol, dan asam pada kombucha bunga telang diduga dapat menimbulkan efek toksik. Etanol memiliki kandungan radikal bebas sehingga dapat menyebabkan stres oksidatif vaskular. Polifenol aktif ketika berada dalam sistem darah dengan konsentrasi yang tinggi, maka akan menghasilkan konsentrasi H_2O_2 dan derivatif lainnya yang relatif tinggi, sehingga menginduksi stres oksidatif. Stres oksidatif berkontribusi pada perkembangan disfungsi endotel dan penyakit kardiovaskular, seperti hipertensi. Saat terjadi hipertensi, pembuluh darah mendapatkan beban mekanis konstan dari tekanan dan aliran darah yang menyebabkan tekanan internal (*endotelial shear stress*). Sehingga, molekul vasoaktif berupa angiotensin II sebagai vasokonstriktor, dilepaskan oleh sel-sel endotel, menginduksi *remodelling* vaskular sebagai kompensasi. Hasil dari *remodelling* adaptif ini ialah penebalan sel otot polos tunika intima dan deposit kolagen yang menyebabkan sklerosis pembuluh darah ¹⁰.

Berdasarkan penelitian Kole *et al.* 2009, terdapat laporan efek samping dari konsumsi kombucha yaitu asidosis laktat, hepatotoksitas, kegagalan pernapasan, dan *disseminated intravascular coagulation* (DIC). Efek dari asidosis pada ginjal, gangguan metabolisme lipid pada hepar dapat berpengaruh terhadap struktural dinding pembuluh darah. Namun, kandungan yang menyebabkan toksik belum diketahui. Sedangkan, berdasarkan penelitian Permatasari *et al* 2022, kombucha menunjukkan potensi dalam aktivitas antioksidan, *anti-metabolic disorders*, dan efek

anti-inflamasi sehingga dapat dimanfaatkan sebagai minuman terapeutik fungsional. Selain itu, kombucha dinilai memiliki rasa dan warna yang unik sehingga dapat dijadikan alternatif pengobatan herbal yang digemari masyarakat ⁵. Kombucha dapat meningkatkan *gut health* ⁶ dan efek penurunan tekanan darah oleh *Lactobacilli* (sebagian terkait dengan sekresi peptida) terbukti mampu menghambat ACE yang terkait dengan konversi angiotensin I menjadi angiotensin II, yang merupakan vasokonstriktor yang kuat ⁷.

Belum ada penelitian mengenai efek samping dari kombucha bunga telang terhadap aorta pada individu sehat. Sehingga, peneliti perlu melakukan penelitian untuk mengetahui efek kombucha terhadap aorta mencit dan penelitian ini dilakukan dengan mengamati perubahan histologi aorta pada mencit jantan sehat.

METODE PENELITIAN

Desain, Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental murni yang mengenakan desain penelitian *post-test control group only*. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Terpadu Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, dalam rentang waktu September hingga November 2023.

Uji Kelayakan Etik

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan kelayakan etik dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang dengan nomor surat **069/L.E.003/VI/01/2023**.

Pembuatan Kombucha Bunga Telang (KBT)

Bahan yang digunakan dalam pembuatan KBT adalah 1 liter air, simplisia bunga telang 12 gram, gula 150 gram, SCOBY *gel* 5 gram, dan SCOBY *liquid* 83 gram. Air dimasak hingga mendidih. Simplisia bunga telang dimasukkan ke dalam kantung teh dan dicelupkan ke dalam air mendidih selama 5 menit. Selanjutnya, gula ditambahkan dan diaduk. Teh bunga telang, SCOBY *gel*, dan SCOBY *liquid* dimasukkan ke dalam jar kaca. pH kombucha diukur sebelum fermentasi. Setelah itu, kombucha difermentasi selama 10 hari dan diukur pH nya ⁵. Pada penelitian ini, pH kombucha adalah 3,55.

Pemeliharaan dan Perlakuan Hewan Coba

Dalam penelitian ini, 24 mencit jantan digunakan sebagai subjek uji dengan usia 8 minggu dan berat badan 25 gram. Mencit didapat dari indukan lokal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sebelum perlakuan, mencit diaklimatisasi selama 7 hari. Mencit dibagi menjadi 4 kelompok yang berupa Kelompok Kontrol Normal (KN) yaitu yang diberi *aquadest* 1 cc (n=6), Kelompok Perlakuan 1 (K1) yaitu yang

diberi KBT dengan dosis konsentrasi 25% sebanyak 1 cc (n=6), Kelompok Perlakuan 2 (K2) yaitu yang diberi KBT dengan dosis konsentrasi 50% sebanyak 1 cc (n=6), dan Kelompok Perlakuan 3 (K3) yaitu yang diberi KBT dengan dosis konsentrasi 100% sebanyak 1 cc (n=6). KBT diberikan setiap pagi selama 28 hari secara *per os* lambung. Mencit dipelihara dalam kandang dengan suhu $\pm 22-28^{\circ}\text{C}$, sirkulasi udara yang baik, dan bebas dari potensi bahaya. Pencahayaan dalam kandang diatur dengan pola 12 jam terang dan 12 jam gelap. Mencit diberi pakan PARS sebanyak 15% dari berat badan, yaitu ± 4 gram dan air minum secara *ad libitum*. Berat badan mencit ditimbang setiap minggu dan pakan mencit ditimbang setiap hari. Pada akhir penelitian (hari ke-28), mencit dianestesi dengan ketamin 1 mg/KgBB IM dan dilakukan pembedahan untuk mengambil aorta. Aorta dari setiap mencit diambil, sehingga total terdapat 24 sampel yang akan dibuat menjadi preparat dan diwarnai dengan pewarnaan hematoxilin eosin dan *masson's trichrome* ¹¹.

Pembuatan Preparat Histologi

Aorta dimasukkan ke dalam alkohol, dari konsentrasi rendah (70%) hingga mencapai konsentrasi tinggi (100%) selama 10 menit per konsentrasi. Selanjutnya, aorta direndam dalam campuran larutan alkohol dan xylol dengan perbandingan 1:1 selama 30 menit ¹². Kemudian, aorta direndam dalam xylol selama 40 menit, dua kali ulangan dan dimasukkan ke dalam tiga jenis parafin murni yang berbeda. Cetakan blok diisi dengan parafin cair dan aorta ditempatkan di dalamnya ¹³. Blok jaringan yang telah dibekukan ditempatkan pada mikrotom dan dipotong dengan memutar kedua sisi mikrotom ke arah yang sama. Pita parafin yang terbentuk diregangkan dengan air dingin dan direndam dalam *waterbath* dengan suhu $56-58^{\circ}\text{C}$ selama beberapa detik hingga mengembang sempurna. Terakhir, preparat dilapisi dengan entellan ¹⁴.

Pewarnaan Preparat Aorta dengan Hematoxilin Eosin (HE)

Preparat direndam secara bertahap dalam tiga larutan xylol selama 3 menit. Preparat dicelupkan ke dalam alkohol (100%, 95%, 80%, 70%) selama 2 menit di setiap tahap. Preparat dicuci dengan air mengalir selama 3 menit. Selanjutnya preparat direndam dalam larutan Mayer hematoxilin selama 7 menit untuk memberi warna biru pada inti sel. Preparat dicuci dengan air mengalir selama 7 menit. Preparat direndam dalam larutan eosin selama setengah menit untuk memberi warna merah pada sitoplasma, jaringan ikat, dan komponen lainnya. Setelah preparat dicelupkan ke dalam air, selanjutnya dimasukkan ke dalam alkohol bertingkat (70%, 80%, 95%, 100%). Kelebihan cairan di sekitar preparat dihapus dengan hati-hati. Selanjutnya, preparat direndam dalam

xylol selama 2 menit. Terakhir, preparat diberi entellan permanen ¹⁵.

Pewarnaan Preparat Aorta dengan Masson's Trichrome (MT)

Preparat ditempatkan dalam xylol untuk proses deparafinisasi selama sekitar ± 3 menit. Setelah itu, preparat direndam dalam larutan alkohol dengan konsentrasi yang bergradasi (70%, 95%, 100%) masing-masing selama sekitar ± 2 menit. Proses pencucian preparat dilakukan dengan air mengalir selama sekitar ± 3 menit. Selanjutnya, preparat direndam dalam larutan Bouin selama satu jam, diikuti dengan pencucian menggunakan air mengalir selama 5-10 menit. Preparat kemudian diwarnai dengan larutan *weigert's iron hematoxylin* selama 10 menit, diikuti oleh pencucian dengan air keran hangat selama 10 menit dan air biasa. Proses berlanjut dengan merendam preparat dalam larutan *Biebrich scarlet-acid fuchsin* selama 10-15 menit, diikuti oleh pencucian dengan air. Preparat kemudian direndam dalam larutan *phosphomolybdic-phosphotungstic acid* selama 10-15 menit dan dipindahkan langsung ke dalam larutan *aniline blue* selama 5-10 menit. Setelah itu, preparat dicuci dengan air, direndam dalam larutan *acetic acid* 1% selama 2-5 menit, dan dicuci kembali dengan air suling. Terakhir, dehidrasi preparat menggunakan etil alkohol 95% dan pembersihan menggunakan *xylene*.

Penghitungan Ketebalan Dinding Aorta

Ketebalan dinding aorta diukur dengan mikroskop trinokuler dengan perbesaran 400x, dan hasil pengukuran dicatat dalam satuan μm . Untuk menentukan ketebalan yang normal, perhitungan rata-rata dilakukan dari kelompok kontrol. Selanjutnya, kelompok lainnya dibandingkan dengan kelompok kontrol untuk menentukan apakah terjadi penebalan. Pengukuran ketebalan dinding aorta dilakukan pada potongan melintang yang dibagi menjadi 8 lapang pandang. Setelah itu, rata-rata dari ke-8 lapang pandang tersebut dihitung ¹⁵. Penghitungan dilakukan dengan bantuan aplikasi *ImageJ* dan diamati oleh tiga pengamat. Setelahnya, hasil penghitungan dari ketiga pengamat dihitung rata-rata.

Penghitungan Luas Area Kolagen pada Aorta

Pengamatan preparat dilakukan dengan menggunakan mikroskop trinokuler dengan perbesaran 400x pada 4 lapang pandang sampel preparat. Penghitungan luas area jaringan kolagen menggunakan perangkat lunak *ImageJ*. Pengamatan dilakukan oleh tiga pengamat dan hasil dari ketiga pengamat akan dihitung rata-rata. Pertama, gambar diubah tipenya menjadi "8-bit" pada *Image J*. Setelah itu, menu *image* dipilih dan dilanjutkan ke *adjust* lalu "*threshold*". Pada menu *threshold*, gambar yang berwarna biru akan dipilih secara khusus dan persentase area warna biru dihitung secara otomatis. Hasil penghitungan berupa

persentase (%) yaitu luas area kolagen dibagi luas aorta dikali 100¹⁷.

Teknik Analisis Data

Data yang telah dihimpun dinyatakan dalam bentuk rata-rata $\pm$ SD. Selanjutnya, dilakukan pengujian menggunakan uji *Shapiro-Wilk* untuk mengevaluasi apakah data homogen dan terdistribusi normal. Setelah itu, analisis statistik dilakukan menggunakan uji *One-way ANOVA* untuk menilai perbedaan antar kelompok, dengan tingkat signifikansi yang ditetapkan pada $p < 0,05$.

HASIL DAN ANALISIS DATA

Karakteristik Penelitian

Karakteristik penelitian dapat dilihat dari sampel penelitian, dosis konsentrasi KBT, lama penelitian, pakan serta jumlah mencit, dan variabel yang diukur. Karakteristik penelitian dapat dilihat pada **Tabel 1**.

Efek Pemberian Kombucha Bunga Telang (KBT) terhadap Ketebalan Dinding Aorta

Hasil penelitian pemberian KBT dengan dosis konsentrasi 25%, 50%, dan 100% sebanyak 1 cc yaitu terjadi penurunan pada ketebalan dinding

aorta dibandingkan dengan kelompok normal. K1 mengalami penurunan sebesar 1,93%, K2 mengalami penurunan sebesar 11,6%, dan K3 mengalami penurunan sebesar 7,75%. Hasil analisa secara statistik tidak didapatkan perbedaan yang signifikan antara kelompok normal dengan semua kelompok dosis KBT. Perbedaan pada ketebalan dinding aorta mencit antar kelompok dapat diamati pada **Gambar 1 dan Tabel 2**.

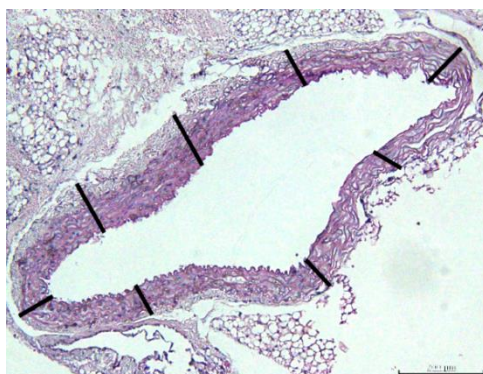
Efek Pemberian Kombucha Bunga Telang (KBT) terhadap Luas Area Kolagen Aorta

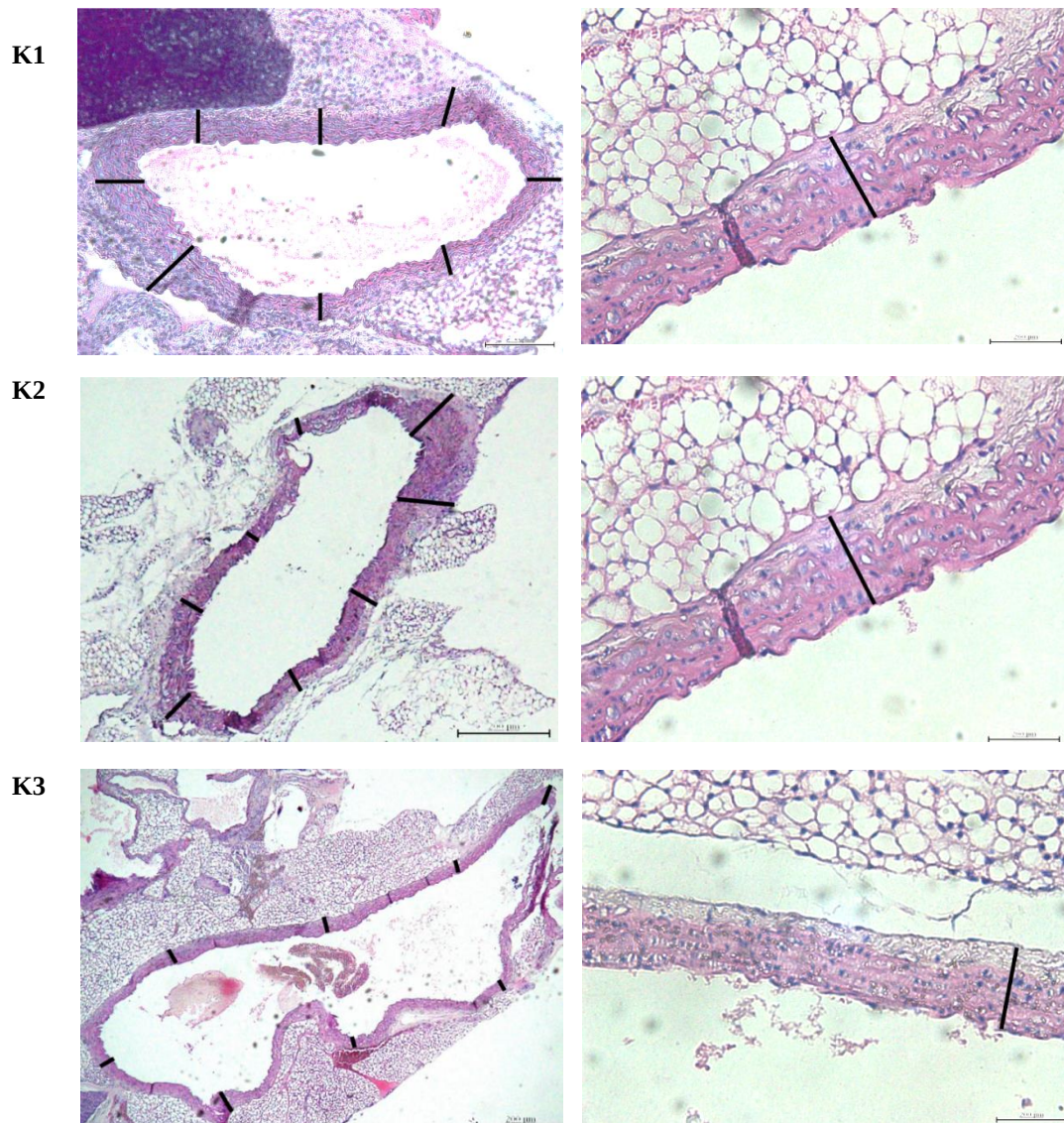
Hasil penelitian pemberian KBT dengan dosis konsentrasi 25%, 50%, dan 100% sebanyak 1 cc yaitu terjadi penurunan pada luas area kolagen aorta dibandingkan dengan kelompok normal. K1 mengalami penurunan sebesar 2,81%, K2 mengalami penurunan sebesar 10,35%, dan K3 mengalami penurunan sebesar 4,22%. Hasil analisa secara statistik tidak didapatkan perbedaan yang signifikan antara kelompok normal dengan semua kelompok dosis KBT. Perbedaan pada luas area kolagen aorta mencit antar kelompok dapat diamati pada **Gambar 1 dan Tabel 2**.

Tabel 1. Karakteristik Penelitian

Keterangan	Kelompok							
	KN		K1		K2		K3	
Sampel Populasi	Mencit jantan		Mencit jantan		Mencit jantan		Mencit jantan	
Pemberian KBT Per Oral	Aquadest 1 cc		Dosis 25%	konsentrasi	Dosis 50%	konsentrasi	Dosis 100%	konsentrasi
Lama Penelitian	28 hari		28 hari		28 hari		28 hari	
Pakan	PARS 15% dari BB		PARS 15% dari BB		PARS 15% dari BB		PARS 15% dari BB	
Jumlah Mencit	6 ekor		6 ekor		6 ekor		6 ekor	
Variabel yang Diukur	Ketebalan dinding dan luas area kolagen aorta		Ketebalan dinding dan luas area kolagen aorta		Ketebalan dinding dan luas area kolagen aorta		Ketebalan dinding dan luas area kolagen aorta	

KN





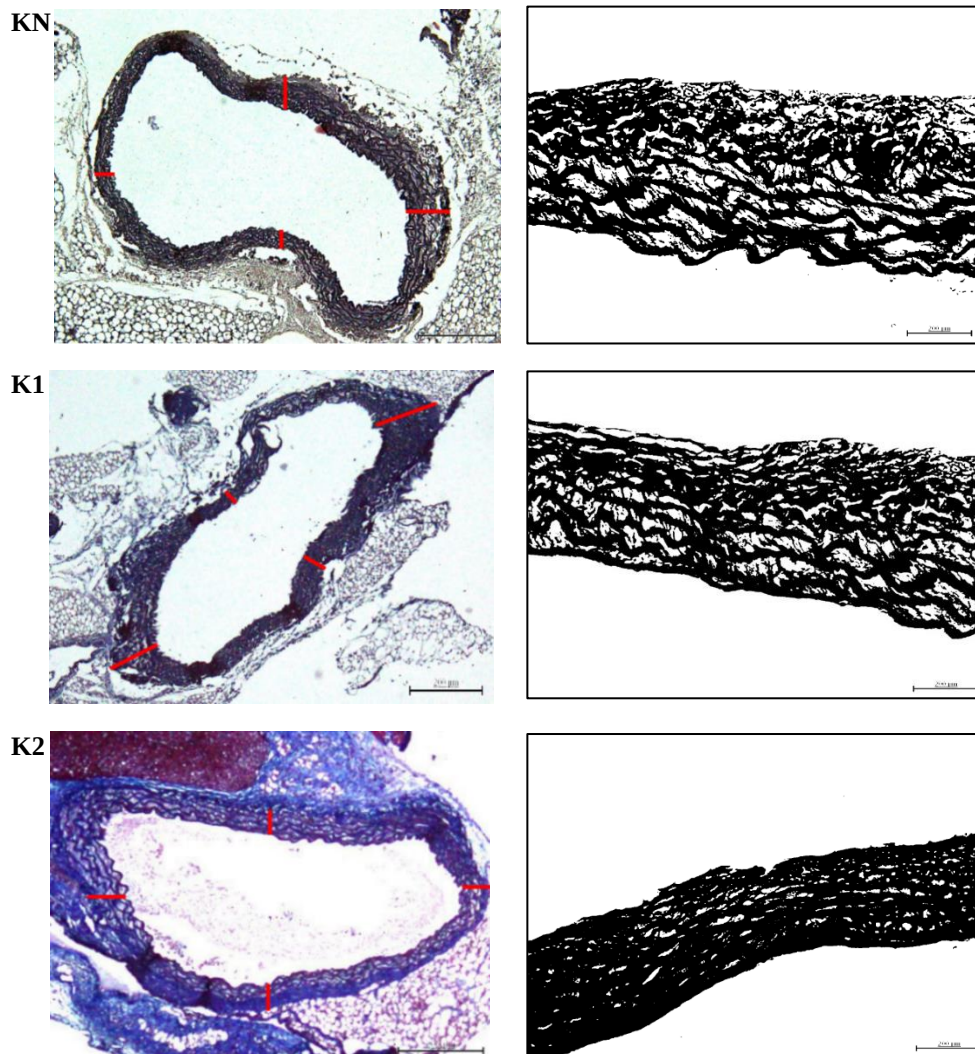
Gambar 1. Histologi Aorta Mencit Perwarnaan *Hematoxilin Eosin* (100x dan 400x dengan mikroskop trinokuler)

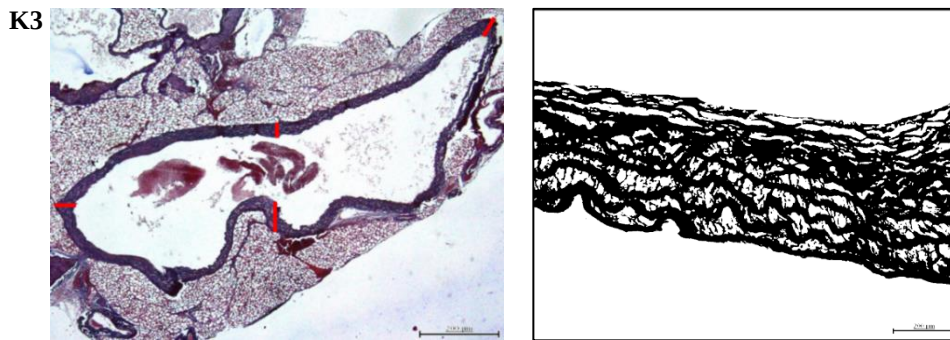
Keterangan: Gambar 1 menunjukkan pembagian 8 lapang pandang aorta mencit perbesaran 100x dengan pewarnaan *Hematoxilin Eosin* (kiri) dan pengukuran ketebalan dinding aorta perbesaran 400x yang ditandai dengan garis hitam (kanan).

Tabel 2. Hasil Pengukuran Histologi Aorta

Kelompok perlakuan	Dosis	Ketebalan Dinding Aorta $\pm$ SD (μ m)
Normal	Aquades 1 cc/hari	258.41 $\pm$ 33.3
Perlakuan 1	KBT 25% 1 cc/hari	252.64 $\pm$ 17.6
Perlakuan 2	KBT 50% 1 cc/hari	227.74 $\pm$ 25.9
Perlakuan 3	KBT 100% 1 cc/hari	237.60 $\pm$ 24

Keterangan: Tabel 2 menunjukkan pengukuran ketebalan dinding aorta (μ m) mencit yang diberi kombucha bunga telang. Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan uji *Oneway ANOVA* dan hasil menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan ($p>0,05$) antara kelompok normal dengan semua kelompok perlakuan.





Gambar 3. Histologi Aorta Mencit Perwarnaan Masson Trichrome (100x dan 400x, dengan mikroskop trinokuler)

Keterangan: Gambar 3 menunjukkan pembagian 4 lapang pandang histologi aorta mencit dengan pewarnaan Masson's Trichrome dengan perbesaran 100x (kiri) dan gambaran histologi aorta mencit dengan penyesuaian type 8-bit dan threshold pada ImageJ (kanan).

Tabel 3. Hasil Pengukuran Histologi Aorta

Kelompok perlakuan	Dosis	Luas Area Kolagen $\pm$ SD (%)
Normal	Aquades 1 cc/hari	17 $\pm$ 0.41
Perlakuan 1	KBT 25% 1 cc/hari	16.89 $\pm$ 0.48
Perlakuan 2	KBT 50% 1 cc/hari	16.4 $\pm$ 0.81
Perlakuan 3	KBT 100% 1 cc/hari	16.84 $\pm$ 0.57

Keterangan: Tabel 3 menunjukkan pengukuran luas area kolagen aorta (%) mencit yang diberi kombucha bunga telang. Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan uji *Oneway ANOVA* dan hasil menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan ($p>0,05$) antara kelompok normal dengan semua kelompok perlakuan.

PEMBAHASAN

Karakteristik Penelitian

Penelitian ini menggunakan mencit jantan sebagai hewan coba karena mampu memberikan hasil penelitian yang lebih konsisten, tanpa terpengaruh oleh siklus estrus dan kehamilan. Pemilihan mencit ini juga memudahkan pengontrolan asupan makanan dan aktivitas fisik, sehingga dapat mengurangi kemungkinan adanya bias dalam penelitian^{18, 14}

Penentuan jumlah mencit per ekor dilakukan menggunakan rumus *Federer* $(n-1) \times (t-1) \geq 15$ dan hasil penghitungan ialah 6 ekor mencit per kelompok. Rumus ini sesuai dengan prinsip kesejahteraan hewan (*animal welfare*) yaitu 3R berupa *replacement* yang berfokus pada menggantikan penggunaan hewan dalam penelitian dan mempertimbangkan penggunaan hewan yang lebih rendah dalam hierarki, seperti mengganti monyet dengan tikus, tikus dengan unggas, dan seterusnya. Selanjutnya, *reduction*, tujuannya adalah mengurangi jumlah hewan yang digunakan dalam penelitian dengan tetap menghasilkan data yang relevan. Hal ini mencakup upaya untuk maksimalkan hasil yang dapat diperoleh dari setiap

eksperimen tanpa meningkatkan jumlah hewan atau perlakuan, dengan tujuan meminimalkan penderitaan dan jumlah hewan uji. Terakhir, *refinement*, berkaitan dengan upaya untuk memodifikasi manajemen pemeliharaan dan prosedur penelitian sehingga kesejahteraan hewan meningkat dan rasa sakit serta stres pada hewan uji dapat dikurangi atau dihilangkan¹⁹.

Dosis konsentrasi KBT yang digunakan adalah 25%, 50%, dan 100% sebanyak 1 cc. Dosis ini merupakan *trial dose* karena belum ada *fixed dose* dari penelitian mengenai KBT yang sebelumnya. Volume maksimal pemberian per oral pada mencit adalah 1 cc, menyesuaikan dengan kapasitas maksimal lambung mencit, sehingga dosis konsentrasi masing-masing kelompok dilarutkan dengan *aquadest* hingga sejumlah 1 cc. KN diberikan 1 cc *aquadest* agar tidak terjadi bias dalam penelitian. Penelitian dilakukan selama 28 hari mengikuti mengikuti panduan BPOM untuk penelitian yang dilakukan secara sub akut¹¹.

Kandungan polifenol aktif yang tergradasi setelah fermentasi, bakteri kombucha, dan etanol pada KBT dapat menghasilkan efek anti-inflamasi dan anti-hipertensi. Sehingga, penelitian ini

dilakukan dengan meneliti efek KBT pada aorta, sebagai arteri terbesar yang menerima darah yang dipompa dari ventrikel kiri jantung dan mendistribusikan ke seluruh tubuh melalui sirkulasi sistemik. Pada hipertensi, pembuluh darah mendapatkan beban mekanis konstan dari tekanan dan aliran darah yang menyebabkan tekanan internal (*endotelial shear stress*). Sehingga, molekul vasoaktif berupa AngII sebagai vasokonstriktor, dilepaskan oleh sel-sel endotel, menginduksi *remodelling* vaskular sebagai kompensasi. Hasil dari *remodelling adaptif* ini ialah penebalan sel otot polos endotel dan deposit kolagen yang dapat menyebabkan sklerosis pembuluh darah¹⁰.

Efek Pemberian Kombucha Bunga Telang (KBT) terhadap Ketebalan Dinding dan Luas Area Kolagen

Ketebalan dinding aorta pada KN merupakan ketebalan yang normal, sesuai dengan studi yang dilakukan oleh Sudarmono *et al.* 2021 yang menyebutkan tebal dinding arteri pada mencit sehat adalah 178,13 μ m²⁰. Luas area kolagen KN juga sesuai dengan luas area kolagen pada mencit yaitu sekitar 10,83-14,17%²¹. Dalam penelitian ini, didapatkan bahwa pemberian KBT pada semua dosis konsentrasi tidak menyebabkan adanya perbedaan ketebalan dinding aorta pada semua kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol ($p=0,197$). Namun, terdapat kecenderungan penurunan ketebalan dinding aorta yaitu pada K1 sekitar 1,93%, K2 sebesar 11,6%, dan K3 sebesar 7,75%. Penelitian ini juga menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan persentase luas area kolagen pada semua kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol ($p=0,202$). Terdapat kecenderungan penurunan persentase luas area kolagen yaitu K1 sebesar 4,3%, K2 sebesar 6,56%, dan K3 sebesar 6,39%.

ROS diproduksi dalam jumlah sedikit di *vascular smooth muscle cells* (VSMCs), adventisia, dan sel endotel pembuluh darah dalam kondisi normal, berperan sebagai mediator dalam regulasi aktivitas vaskular, serta berpartisipasi dalam pertumbuhan VSMCs dan mengatur kontraksi-relaksasi. Namun, pada kondisi patologis, terjadi ketidakseimbangan antara antioksidan dan oksidan, dan ketika oksidan mendominasi, stres oksidatif terjadi. Endotelium merupakan salah satu jaringan pertama yang terpengaruh dalam aterosklerosis, di mana molekul-molekul seperti nitrat oksida (NO), endotelin I, angiotensin II, molekul adhesi, dan sitokin diproduksi. Stres oksidatif dapat menyebabkan beban mekanis konstan (*endotelial shear stress*) sehingga dapat memengaruhi fungsi sel, menyebabkan disfungsi endotel, dan mengurangi produksi NO²².

Disfungsi endotel ditandai dengan vasodilatasi yang berkurang, kondisi pro-trombotik, keadaan pro-inflamasi, dan penurunan NO yang menyebabkan terjadinya *remodelling* pembuluh darah berupa migrasi sel otot polos di lapisan

intima, deposit kolagen, dan deposit lemak. Peristiwa-peristiwa ini menyebabkan terjadinya peningkatan ketebalan dinding dan persentase luas area kolagen aorta.

KBT dapat digunakan sebagai obat herbal antihipertensi. Penelitian yang dilakukan oleh Maneesai *et al* (2021) menjelaskan bahwa fitokimia utama dari ekstrak *Clitoria ternatea* (CT), flavonoid, mampu mencegah hipertensi pada tikus. CT dapat menurunkan stres oksidatif pada tikus dengan menurunkan generasi superoksida dan peroksidasi lipid plasma, serta meningkatkan aktivitas *catalase* (CAT). Selain itu, pada penelitian Grosso *et al* (2022), dibuktikan bahwa senyawa-senyawa seperti antosianin, flavonoid, flavon, flavanon, flavan-3-ol, flavonol, isoflavan, dan resveratrol pada CT memiliki kemampuan meningkatkan bioavailabilitas NO dalam aliran darah dengan merangsang *inducible NO synthase* (iNOS) dan *endothelial NO synthase* (eNOS).

Dengan adanya flavonoid pada CT, maka CT dapat mencegah stres oksidatif. Flavonoid menangkal radikal bebas dengan menyumbangkan elektron kepada peroksinitrit, radikal hidroksil, dan radikal peroksil, mengurangi tingkat spesies oksigen dan nitrogen reaktif, karena pembentukan radikal flavonoid yang stabil sehingga mampu menstabilisasi radikal-radikal tersebut. Efek antioksidan flavonoid dicapai melalui tiga mekanisme: 1) dengan menghilangkan *reactive oxygen species* (ROS), 2) dengan mencegah produksi ROS, akibat interaksi flavonoid dengan enzim yang mengendalikan produksi radikal bebas, atau 3) dengan meningkatkan perlindungan sistem antioksidan²².

Terlepas dari manfaatnya, polifenol tetap memiliki kelemahan berupa *half-life* yang singkat dan bioavailabilitas yang rendah setelah dikonsumsi secara oral. Hal ini mungkin disebabkan oleh interaksi antara polifenol dan polisakarida yang terikat serta pembentukan glikosida melalui interaksi *coulombic*, ikatan hidrogen, dan gaya interaksi π - π , yang mengakibatkan aktivitas biologis dari polifenol yang terglisosilasi menjadi berkurang. Kombucha, yang merupakan minuman fermentasi, dapat meningkatkan aktivitas polifenol. Penelitian yang dilakukan Yang *et al* (2023) menjelaskan bahwa *polyphenol-rich fermented foods* (PFFs) memiliki bioavailabilitas dan bioaktivitas yang lebih baik daripada *polyphenol-rich foods* yang tidak difermentasi karena polifenol digunakan sebagai substrat selama fermentasi dan dihidrolisis menjadi senyawa fenolik yang lebih kecil (seperti *quercetin*, kaempferol, *gallic acid*, *ellagic acid*, dan lain-lain) dengan bioaktivitas dan bioavailabilitas yang lebih tinggi melalui *polyphenol-associated enzymes* (PAEs). Selama proses fermentasi PFFs, ikatan glikosidik pada polifenol berbobot molekul besar (*large-molecular-weight*) dapat diurai oleh mikroorganisme dan terdegradasi. Glukosida yang terdegradasi dapat langsung dimanfaatkan oleh mikroorganisme intestinal yang bermanfaat sebagai sumber karbon,

sehingga meningkatkan jumlah bakteri baik. Biotransformasi ini meningkatkan jumlah dan jenis fenol bebas dalam substrat yang difermentasi, sehingga meningkatkan fungsi dan bioavailabilitas nutrisinya²³

Tidak hanya itu, polifenol bersama dengan bakteri kombucha dapat berfungsi sebagai anti-inflamasi yang meningkatkan *gut health*. Nutrisi menyebar ke seluruh tubuh melalui peredaran sistemik, sehingga dapat mengurangi inflamasi sistemik dan stres oksidatif pada pembuluh darah²⁴. Sehingga, dapat disimpulkan bahwa KBT dapat meningkatkan bioavailabilitas NO, menghambat vasokonstriktor seperti AngII dan endotelin I sehingga tidak terjadi peningkatan proliferasi dan migrasi sel otot polos, serta menghambat sintesis matriks ekstraseluler, sehingga tidak terjadi peningkatan akumulasi kolagen dan ketebalan dinding pembuluh darah pada K1, K2, dan K3.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa peningkatan dosis tidak meningkatkan efek. Hal ini ditunjukkan melalui dosis II yang diduga merupakan dosis optimal untuk menurunkan ketebalan atau persentase luas area kolagen. Efek suatu herbal ditentukan oleh jumlah reseptor yang ditempati. Semakin banyak reseptor yang ditempati maka akan semakin tinggi efek yang ditimbulkan. Namun, jumlah reseptor pada sel target umumnya tidak stabil dari waktu ke waktu, bahkan dapat berubah dalam rentang menit. Protein reseptor kadang-kadang tidak aktif atau mengalami kerusakan selama fungsinya berjalan dan pada saat lain dapat mengalami reaktivasi atau pembentukan baru melalui mekanisme pembentukan protein di dalam sel. Selain itu terdapat efek *down regulation* dari reseptor. Semakin tinggi dosis KBT yang diberikan akan menyebabkan kadar senyawa aktif yang berikatan dengan reseptor semakin banyak sehingga terjadi fenomena *down regulation* reseptor untuk menurunkan efek²⁵.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan penelitian, dapat disimpulkan bahwa:

1. Pemberian kombucha bunga telang dengan dosis konsentrasi 25%, 50%, 100% sebanyak 1 cc tidak meningkatkan ketebalan dinding aorta mencit jantan sehat.
2. Pemberian kombucha bunga telang dengan dosis konsentrasi 25%, 50%, 100% tidak meningkatkan luas area kolagen pada aorta mencit jantan sehat.

SARAN

Untuk perkembangan penelitian selanjutnya dapat disarankan untuk:

1. Melakukan perhitungan kadar flavonoid dan etanol pada kombucha bunga telang.
2. Penelitian dapat ditingkatkan dengan menggunakan dosis KBT yang lebih tinggi

dan waktu penelitian yang lebih lama, melebihi 28 hari.

3. Penelitian dilanjutkan dengan menggunakan tikus model hipertensi untuk meneliti potensi KBT sebagai obat herbal anti-hipertensi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan rasa terima kasih kepada Ikatan Orangtua Mahasiswa (IOM) Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang atas bantuan dan dukungannya dalam proses penelitian ini serta kepada tim kelompok penelitian yang telah bekerja sama melakukan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Sawicka K, Szczyrek M, Jastrzębska I, Prasal M, Zwolak A, Daniluk J. Hypertension - The Silent Killer. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*. 2011;43-36.
2. Kementerian Kesehatan RI. *Hasil Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2018*. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian RI; 2018.
3. Rizkawati M, Fairus RA, Absari NW. Potensi Tanaman Herbal Bunga Telang (*Clitoria ternatea*) sebagai Alternatif Antihipertensi. *Healthy Tadulako Journal*. 2023;9(1):1-8.
4. Antolak H, Piechota D, Kucharska. Kombucha Tea—A Double Power of Bioactive Compounds from Tea and Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts (SCOBY). *Antioxidants*. 2021;10(10):1541.
5. Permatasari HK, Nurkolis F, Gunawan WB, et al. Modulation of Gut Microbiota and Markers of Metabolic Syndrome in Mice on Cholesterol and Fat Enriched Diet by Butterfly Pea Flower Kombucha. *Current Research in Food Science*. 2022;5:1251-1265.
6. Higashi Y. Roles of Oxidative Stress and Inflammation in Vascular Endothelial Dysfunction-Related Disease. *Antioxidants*. 2022;11(10):1958.
7. Bhat MA, Mishra AK, Tantray JA, et al. Gut Microbiota and Cardiovascular System: An Intricate Balance of Health and the Diseased State. *Life*. 2022;12(12):1986.
8. Chauhan N, Rajvaidhya , Dubey BK. Pharmacognostical, Phytochemical AND Pharmacological Review on *Clitoria ternatea* for Antiasthmatic Activity. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2012;3(2):398-404.
9. Grosso , Godos J, Currenti W, et al. The Effect of Dietary Polyphenols on Vascular Health and Hypertension: Current Evidence and Mechanisms of Action. *Nutrients*. 2022;14:545.
10. Lu D, Kassab GS. Role of Shear Stress and Stretch in Vascular Mechanobiology. *J R Soc*

- Interface*. 2011;8(63):1379-85.
11. BPOM. *Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia tentang Pedoman Praktek Secara In Vivo*: Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia; 2020.
 12. Bancroft D, Suvana KS, Layton C. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. 8 ed. Edinburgh: ELSEVIER; 2018.
 13. Setyawati A, Atmowidi T, Kiranadi B. Struktur Histologi Hati, Ginjal dan Pankreas Mencit (*Mus musculus*) dengan Perlakuan Ekstrak Batang Akar Kuning (*Fibraurea tinctoria* L.) Selama Organogenesis. *IPB Repository*. 2015.
 14. Putri LM. Gambaran Kerusakan Histopatologi Jantung pada Mencit yang Diinduksi Alokasi dan dengan Pemberian Ekstrak Daun Kersen (*Muntingia calabura*). *DIGILIB UNILA*. 2022.
 15. Dewanti A. Pengaruh Pemberian Mentega Putih Bertingkat terhadap Ketebalan Pembuluh Darah Aorta Abdominalis pada Tikus Putih Galur Wistar (*Rattus Norvegicus*). *Dspace Repository*. 2017.
 16. Medical Center University of Rochester. Masson Trichrome Stain. *University of Rochester*. 2020;15510:1-2.
 17. Kiernan JA. *Histological and Histochemical Method: Theory and Practice*. 2 ed. Australia: Pergamon Press; 2011.
 18. Kartikawati E, Deswati DA, Pramudita B. Uji Efek Analgetik Ekstrak Etanol Daun Asam Jawa (*Tamarindus indica* L.) pada Mencit Jantan Galur Swiss Webster. *Jurnal Sabdariffarma*. 2021;9(1):11-18.
 19. Rusche B. The 3Rs and Animal Welfare - Conflict or the Way Forward? *ALTEX*. 2003;20(Suppl 1):63-76.
 20. Sudarmono A, Dewi IWS. Pengaruh Pemberian L-Arginine terhadap Perbaikan Kerusakan Endotel Arteri Koroner pada Jantung Mencit (*Mus Musculus*) Model Preeklampsia. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan: Publikasi Ilmiah Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya*. 2021;9(1).
 21. Pramudiawan IB. Ekspresi TGF- β 1 dan Kolagen Tipe 1 pada Ventrikel Kanan Tikus Model Hipertensi Arteri Pulmonal yang Mendapat Ekstrak Buah Delima. *Repository UNAIR*. 2016.
 22. Ciumărnean L, Milaciu MV, Runcan O, et al. The Effects of Flavonoids in Cardiovascular Diseases. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2020;25(18):4320.
 23. Yang F, Chen C, Ni D, et al. Effects of Fermentation on Bioactivity and the Composition of Polyphenols Contained in Polyphenol-Rich Foods: A Review. *Foods*. 2023;12:3315.
 24. Mangiola F, Nicoletti A, Gasbarrini A, Ponziani FR. Gut Microbiota and Aging. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22(21):7404-7413.
 25. Nugroho RA. *Dasar-Dasar Endokrinologi*. Samarinda: Mulawarman University Press; 2016.
 26. Young CN, Davisson RL. Hypertension. *American Heart Association Journal*. 2015;66(5):920-926.
 27. Valdes M, Walter J, Segal E, Spector D. Role of the Gut Microbiota in Nutrition and Health. *BMJ (Clinical research ed.)*. 2018;k2179:361.
 28. Hajiagha N, Taghizadeh S, Asgharzadeh M, et al. Gut Microbiota and Human Body Interactions; Its Impact on Health: A Review. *Current Pharmaceutical*. 2021;23(1):4-14.
 29. Oparil S, Acelajado MC, Bakris GL, et al. Hypertension. *Nature reviews. Disease primers*. 2018;4:18014.
 30. Rusmiatik. Perbandingan Fiksasi Larutan Bouin dan Formalin. *E-Journal Fakultas Kedokteran Universitas Islam Al-Azhar*. 2019:1-5.
 31. Nummer BA. Kombucha Brewing under The Food and Drug Administration Model Food Code: Risk analysis and Processing Guidance. *Journal of Environmental Health*. 2013;76(4):8-11.
 32. Centre for Disease Control. Food Safety Assessment of Kombucha Tea Recipe and Food Safety Plan: British Columbia. *Environmental Health Services*. 2020:1-14.
 33. Kole AS, Jones HD, Christensen R, Gladstein J. A Case of Kombucha Tea Toxicity. *Journal of Intensive Care Medicine*. 2009;24(3):205-207.
 34. Leal JM, Suarez LV, Jayabalan R, Oros JH, Escalante-Aburto A. A Review on Health Benefits of Kombucha Nutritional Compounds and Metabolites. *CyTA-Journal of Food*. 2018;16(1):390-399.
 35. Sena CM, Leandro A, Azul L, Seica R, Perry G. Vascular Oxidative Stress: Impact and Therapeutic Approaches. *Frontiers in Physiology*. 2018;9.
 36. Chu SC, Chen C. Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. *Food Chemistry*. 2006;98(3):502-507.
 37. Crum H, LaGory A. *The big book of kombucha: brewing, flavoring, and enjoying the health benefits of fermented tea*: Storey Publishing; 2016.
 38. Chu SC, Chen S. Effects of Origins and Fermentation Time on The Antioxidant Activities of Kombucha. *Food Chemistry*. 2006;98(3):502-507.
 39. Bishop P, Pitts ER, Budner D, Thompson-Witrick KA. Kombucha: Biochemical and Microbiological Impacts on the Chemical and Flavor Profile. *Food Chemistry Advances*.

- 2022;1:100025.
40. Crum H, LaGory A. *The Big Book of Kombucha: Brewing, Flavoring, and Enjoying the Health Benefits of Fermented Tea*. North Adams, MA: Story Publishing; 2016.
 41. Hur SJ, Lee SY, Kim YC, Choi I, Kim GB. Effect of Fermentation on the Antioxidant Activity in Plant-based Foods. *Food Chemistry*. 2014;160:346-356.
 42. David L, Britton SJ, Clippeleer JD. Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Kombucha Tea Fermentation: A Review. Journal of The American Society of Brewing Chemist*. 2020;78(3):165-174.
 43. Lu D, Kassab GS. Role of shear stress and stretch in vascular mechanobiology. *Journal of the Royal Society, Interface*. 2011;8(63):1379-1385.