

**PENGARUH PEMBERIAN SEDUHAN KELOPAK BUNGA
ROSELLA (*Hibiscus sabdariffa*) DOSIS BERTINGKAT SELAMA
30 HARI TERHADAP GAMBARAN HISTOLOGIK GINJAL
TIKUS WISTAR**



ARTIKEL ILMIAH

**Diajukan guna memenuhi tugas dan melengkapi persyaratan
dalam menempuh Program Pendidikan Sarjana
Fakultas Kedokteran**

Disusun oleh :

**BRILIANTI DWI WULANDARI
G2A006031**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2010**

**PENGARUH PEMBERIAN SEDUHAN KELOPAK BUNGA ROSELLA
(*Hibiscus sabdariffa*) DOSIS BERTINGKAT SELAMA 30 HARI TERHADAP
GAMBARAN HISTOLOGIK GINJAL TIKUS WISTAR**

Brilianti Dwi Wulandari ¹, Akhmad Ismail ²

ABSTRAK

Latar Belakang : Rosella (*Hibiscus sabdariffa*) merupakan obat herbal yang digunakan sebagai antihipertensi, antikanker, diuretik, peluruh batu ginjal, antikolesterol, antibakteri, dsb. Rosella diekskresi melalui ginjal sedangkan penggunaan obat herbal dalam jangka lama terutama tanaman yang bersifat diuretik dapat menyebabkan kerusakan ginjal. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan apakah ada perubahan gambaran histologik ginjal tikus wistar setelah pemberian rosella dalam berbagai dosis selama 30 hari.

Metode : Penelitian eksperimental dengan *Post Test Only Control Group Design*. Jumlah sampel 20 ekor tikus wistar dibagi secara acak menjadi 4 kelompok. Kelompok kontrol diberi pakan standar sedangkan kelompok P1, P2, P3 diberi rosella dengan dosis berturut-turut 40,60, dan 90 mg/hari secara oral selama 30 hari. Sasaran penilaian adalah jumlah lumen tubulus proksimal yang menutup.

Hasil : Rerata jumlah lumen tubulus proksimal yang menutup pada kelompok K, P1, P2, dan P3 berturut-turut adalah 6,6 ; 21,2 ; 28,4 ; dan 36,8. Analisis dengan *Anova* menunjukkan adanya perbedaan bermakna ($p=0,000$). Uji perbandingan antar kelompok (*Post Hoc*) menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna ($p \leq 0,05$) pada seluruh kelompok dimana K - P1; K - P2 ; K - P3 ; P1 - P3 ($p = 0.000$) , P1 - P2 ($p = 0,027$) , dan P2 - P3 ($p = 0,012$).

Simpulan : Terdapat perbedaan yang bermakna pada gambaran histologik ginjal tikus wistar antara kelompok yang diberi rosella (*Hibiscus sabdariffa*) dengan kelompok yang tidak diberi rosella, sesuai dengan peningkatan dosis.

Kata kunci : Rosella (*Hibiscus sabdariffa*), gambaran histologik ginjal tikus wistar

¹ Mahasiswa program pendidikan S-1 kedokteran umum FK Undip

² Staf pengajar Bagian histologi FK Undip, Jl Dr. Sutomo No.18 Semarang

THE EFFECTS OF ROSELLE (*Hibiscus sabdariffa*) CALYCES STEEPINGS IN VARIOUS DOSES FOR 30 DAYS TO THE HISTOLOGIC FEATURES OF KIDNEY'S WISTAR RATS

Brilianti Dwi Wulandari ¹, Akhmad Ismail ²

ABSTRACT

Background : Rosella (*Hibiscus sabdariffa*) is a herbal medicine used as anti hypertensive, anticancer, diuretic, kidney stone crusher, anticolsterol, antibacterial, etc. Rosella will be excreted by kidney while the using of herbal medicine for long time mainly herb which have diuretic effect can cause destruction of kidney. The purpose of this study is to prove if there is any changes of histological features of wistar rats after giving of rosella in various doses for 30 days.

Methods : This was experimental study with Post Test Only Group Design. The samples were 20 wistar rats, randomized into 4 group. The control groups was only given standard diet, while groups P1, P2, and P3 were given rosella in respectively doses 40, 60 and 90 mg/day by oral in 30 days. The target was the summary of the proximal tubules's space which closed.

Result : The averages of total number of the proximal tubule's space which closed on K, P1, P2, P3 were 6,6 ; 21,2 ; 28,4 ; 36,8. Analysis with Anova showed the significant differences ($p=0,000$). Multiple comparison result (Post Hoc)between groups showed the significant differences ($p \leq 0,05$) in all groups, K - P1; K - P2 ; K - P3 ; P1 - P3 ($p = 0.000$) , P1 - P2 ($p = 0,027$) , P2 - P3 ($p = 0,012$).

Conclusion : There were significant differences on the histological features of kidneys's wistar rats, between groups which was given rosella (*Hibiscus sabdariffa*) with the groups which was not, in accordance with the increasing doses.

Keywords : Rosella (*Hibiscus sabdariffa*), The histologic features of kidneys's wistar rats

¹Medical student of Diponegoro University Semarang

²Histological teacher of Medical Faculty of Diponegoro University Semarang

PENDAHULUAN

Penggunaan obat herbal sebagai alternatif penyembuhan penyakit semakin meningkat di Indonesia karena sebagian besar masyarakat berpendapat bahwa obat herbal tidak mempunyai efek samping.¹ Obat herbal meskipun berbahan alami bukan berarti aman 100% karena tanaman obat pun mengandung racun. Penggunaan obat herbal selama ini hanya bersifat empiris artinya hanya berdasarkan dosis dan efek yang didapat dari pengalaman yang bervariasi tiap-tiap orang. Bukan berdasarkan *evidence based medicine*, dimana obat harus lolos melewati uji fisik, kimiawi, farmakologis, biologis, dan uji toksisitas. Oleh karena itu, sebagian besar dokter belum merekomendasikan penggunaan obat herbal.² Salah satu obat herbal yang makin populer di masyarakat adalah rosella. Berdasarkan penelitian dan pengalaman sekelompok orang yang telah menggunakan kelopak bunga rosella untuk pengobatan terbukti bahwa kelopak bunga rosella sangat berkhasiat. Namun, hingga saat ini penelitian mengenai efek samping akibat konsumsi kelopak bunga rosella tidak sebanyak penelitian mengenai manfaatnya.

Rosella (*Hibiscus sabdariffa*) merupakan anggota famili *Malvaceae*. Kelopak bunga rosella banyak dimanfaatkan sebagai bahan makanan dan minuman.³ Masyarakat lebih sering menggunakan kelopak bunga rosella sebagai minuman yang diseduh.⁴ Secara tradisional, kelopak bunga rosella digunakan sebagai obat herbal antihipertensi, antikanker, diuretik, peluruh batu ginjal, antikolesterol, antibakteri, dan sebagainya. Rosella mengandung protein, vitamin, mineral, dan komponen bioaktif seperti asam organik, *phytosterol*, *polyphenol*, *antosianin* dan *flavonoid*.⁵

Penelitian-penelitian sebelumnya telah membuktikan bahwa ekstrak kelopak bunga rosella berkhasiat. Faraji dan Tarkhani (Tehran's Shariati Hospital, 1998) melakukan uji klinik efek kelopak bunga rosella sebagai antihipertensi. Pasien diberikan konsumsi secangkir seduhan 3 kuntum kelopak bunga rosella. Setelah 12 hari, nilai sistolik pasien rata-rata turun 11,2%, tekanan sistolic turun 7,9%, diastolic 5,6%. Vilasinee Hirunpanicha (Department of Pharmacology, Mahidol University,

Thailand) melakukan penelitian selama 6 minggu terhadap tikus untuk melihat efek antikolesterol dari kelopak bunga rosella. Hasilnya serum kolesterol menurun 22% untuk ekstrak kelopak bunga rosella 500 mg/kg dan 26% untuk 1.000 mg/kg bobot. Penelitian yang dilakukan Ir Didah Nurfarida MSi, periset Ilmu dan Teknologi Pangan, Institut Pertanian Bogor mendapatkan bahwa kandungan antioksidan pada kelopak bunga rosella jumlahnya 1,7 mmmol/prolox, lebih tinggi dibanding kumis kucing yang antioksidannya teruji klinis meluruhkan batu ginjal. Jumlah antioksidan tersebut didapat dengan menggerus 3 kuntum kelopak bunga rosella menjadi 1,5g bubuk dan diberi air 200ml.⁶

Efek samping dari kelopak bunga rosella yang sudah diketahui hanya jantung berdebar dan belum pernah dilaporkan efek samping yang serius. Namun, menurut Peter Harwick, *Native Rosella (Hibiscus heterophyllus)* yang merupakan spesies lain dari rosella bisa menyebabkan kerusakan ginjal jika dikonsumsi.⁷

Zat-zat yang masuk ke dalam tubuh akan mengalami proses farmokinetik berupa absorpsi, distribusi, metabolisme dan ekskresi. Proses ekskresi terutama lewat ginjal. Paparan obat-obatan, logam berat, hasil metabolisme yang berlebihan dan zat-zat lain berpotensi merusak ginjal. Penggunaan obat-obat diuretik mempunyai efek samping berupa nefritis interstitial.⁸ Dan penggunaan Kecibeling (*Strobilantus crispus*) yang bersifat diuretik ternyata jika pemakaiannya berlebihan akan menimbulkan iritasi saluran kemih dan peningkatan eritrosit melebihi batas normal pada urinya.⁹ Karena kelopak bunga rosella juga bersifat diuretik maka hal ini menimbulkan pertanyaan mengenai pengaruh seduhan kelopak bunga rosella terhadap ginjal sehingga mendorong penelitian ini dilakukan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perubahan gambaran histologik ginjal tikus wistar setelah pemberian seduhan kelopak bunga rosella dengan dosis beringkat selama 30 hari. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi pada masyarakat tentang pengaruh kelopak bunga rosella terhadap ginjal dan sebagai bahan acuan untuk penelitian lebih lanjut.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental dengan pendekatan *Post Test Only Control Group Design*. Besar sampel berdasarkan ketentuan WHO dengan jumlah sampel minimal 5 ekor per kelompok.²⁹ Jumlah sampel yang dibutuhkan pada penelitian ini 20 ekor tikus wistar. Sampel dibagi menjadi 4 kelompok secara acak dan tiap kelompok terdiri atas 5 ekor tikus wistar jantan, umur 2-3 bulan, sehat, berat \pm 200 gram, tidak terdapat cacat anatomi. Kelompok kontrol hanya diberi pakan standar. Kelompok perlakuan 1- 3 secara berurutan diberi pakan standard dan seduhan kelopak bunga rosella dengan dosis 40mg, 60mg, dan 90mg per oral sekali sehari selama 30 hari. Setelah perlakuan selama 30 hari, tikus diterminasi kemudian diambil organ ginjalnya lalu difiksasi dengan buffer formalin 10% dan diproses mengikuti metode baku histologik dengan pewarnaan HE. Tiap preparat diamati di bawah mikroskop dalam 5 lapangan pandang pandang yaitu pada keempat sudut dan bagian tengah preparat dengan perbesaran 100x dan 400x. Sasaran yang dibaca adalah lumen tubulus proksimal yang menutup. Dari 20 sel tubulus proksimal tiap lapangan pandang dihitung berapa banyak lumen yang menutup. Hasil tiap lapangan pandang dijumlah. Hasil jumlah tersebut adalah wakil dari nilai kerusakan tubulus proksimal tiap tikus.

Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini adalah data primer hasil pengamatan mikroskopis. Variabel bebas berskala rasio berupa dosis pemberian seduhan kelopak bunga rosella. Variabel tergantung berskala rasio berupa jumlah lumen tubulus proksimal yang mengalami penutupan. Data yang diperoleh dari 4 kelompok sampel diolah dengan program computer SPSS 15.0. Data tersebut diuji normalitasnya dengan uji *Shapiro Wilk*. Uji normalitas didapatkan distribusi data normal, lalu dilanjutkan dengan uji ANOVA dan uji *Post Hoc*.

HASIL PENELITIAN

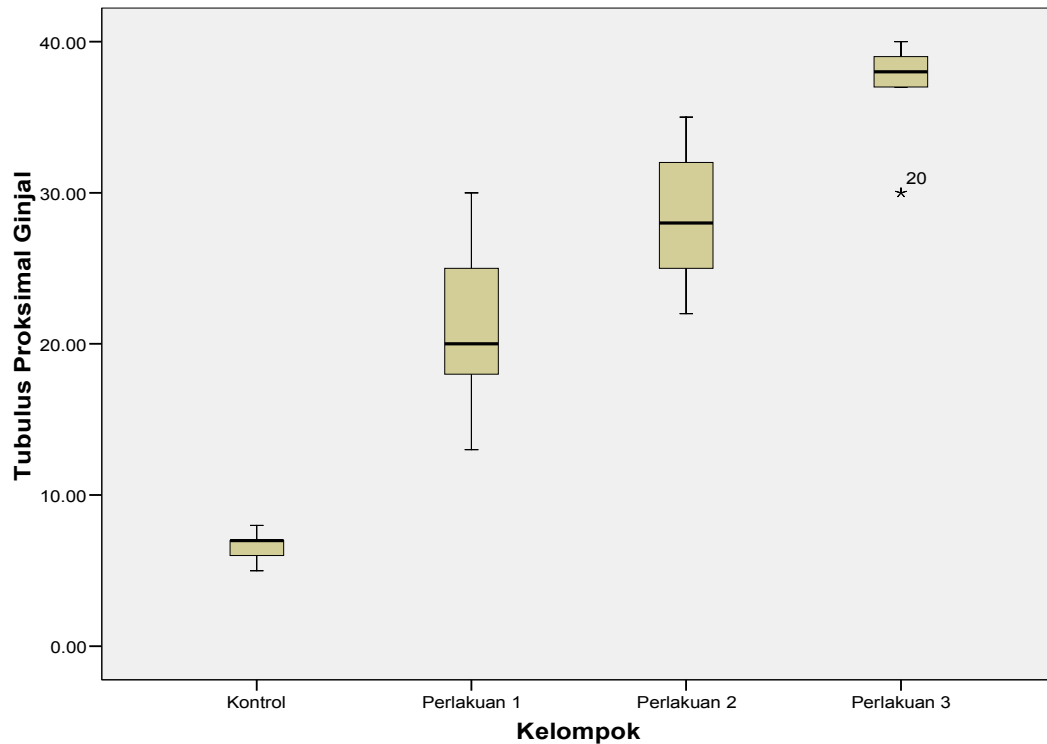
Selama berlangsung penelitian terdapat dua ekor tikus yang dieksklusikan karena mati dengan penyebab kematian diduga akibat trauma fisik dan infeksi, namun jumlah sampel tetap memenuhi syarat penelitian karena diganti dengan sampel cadangan.

Kerusakan tubulus proksimal ginjal tikus wistar diperiksa dengan menghitung jumlah tubulus proksimal yang menutup dalam 5 lapangan pandang. Hasil pemeriksaan dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Rerata jumlah lumen tubulus proksimal yang menutup

Kelompok	Mean	Median	SD
K	6,6	7,0	1,14
P1	21,2	20,0	6,53
P2	28,4	28,0	5,22
P3	36,8	38,0	3,96

Tabel di atas menunjukkan hasil rerata jumlah lumen tubulus proksimal yg menutup paling sedikit pada kelompok perlakuan adalah kelompok P1 dengan nilai mean 21,2 sedangkan yang paling banyak pada kelompok P3 dengan nilai mean 36,8. Dengan diagram box plot dapat terlihat gambaran perubahan kerusakan pada masing-masing kelompok.



Gambar 1. Diagram *box plot* jumlah lumen tubulus proksimal yang menutup

Diagram box plot di atas menunjukkan distribusi data tidak normal karena nilai median tidak di tengah kotak pada kelompok K, P1, dan P2; nilai whisker asimetris pada kelompok P3 dan terdapat nilai ekstrim atau outlier pada kelompok P3.

Data hasil penelitian diuji normalitas dengan *Shapiro Wilk*, dan didapatkan distribusi data normal ($p > 0,05$) sehingga dilanjutkan dengan uji parametric *One Way Anova*. Hasil uji *One Way Anova* didapatkan $p = 0,000$ yang menunjukkan paling tidak terdapat perbedaan

gambaran histologik ginjal tikus wistar yang bermakna pada dua kelompok. Untuk mengetahui pada kelompok mana terdapat perbedaan bermakna maka dilanjutkan dengan uji analisis *Post Hoc*.

Tabel 2. Hasil uji statistik perbandingan antar kelompok (*Post Hoc*)

Kelompok	K	P1	P2	P3
K	-	0,000*	0,000*	0,000*
P1	0,000*	-	0,027*	0,000*
P2	0,000*	0,027*	-	0,012*
P3	0,000*	0,000*	0,012*	-

* : berbeda bermakna ($p \leq 0,05$)

Hasil uji perbandingan antar kelompok (*Post Hoc*) didapatkan $p \leq 0,05$ pada seluruh kelompok. Dengan demikian terdapat perbedaan gambaran histologik ginjal tikus wistar berbeda secara bermakna pada seluruh kelompok.

PEMBAHASAN

30

Perubahan gambaran histologik ginjal tikus wistar pada penelitian ini kemungkinan disebabkan oleh ; 1. Rosella mempunyai sifat diuresis sesuai dengan beberapa penelitian yang menyebutkan penggunaan obat herbal dalam jangka lama secara terus-menerus terutama tanaman yang mempunyai efek diuretik dapat menyebabkan kerusakan ginjal,^{5,9,27} 2. Metabolit yang terdapat pada rosella seperti kalsium dan lain-lain akan diekskresi melalui ginjal sedangkan telah diketahui sebelumnya bahwa sel epitel tubulus ginjal ini peka terhadap anoksia dan mudah rusak karena keracunan akibat kontak dengan bahan-bahan yang diekskresikan lewat ginjal,³² 3. Kandungan vitamin C yang tinggi dalam rosella akan memperberat kerja ginjal sebagaimana diperkirakan para ahli bahwa kelebihan vitamin C secara terus-menerus memicu

terjadinya batu ginjal, efek prooksidan dan memacu kerja ginjal melakukan filterisasi urin sehingga dalam jangka panjang akan melemahkan dan memperpendek usia ginjal.³³

Perubahan histologik ginjal pada penelitian ini juga bisa disebabkan karena :

1. tehnik pengambilan dan pengolahan jaringan yang salah dapat merusak ginjal itu sendiri. Kegagalan dalam satu tahap pengolahan jaringan akan berefek pada proses selanjutnya, 2. Jumlah preparat yang dihitung sedikit sehingga masih kurang mewakili kerusakan ginjal secara keseluruhan sehingga dapat menyebabkan kesalahan dalam menginterpretasikan data.

Kerusakan ginjal dapat diidentifikasi berdasarkan perubahan gambaran histologik yaitu nefritis interstitial yang secara morfologi ditandai dengan sitoplasma yang keruh, pembengkakan sel-sel tubulus proksimal sehingga lumennya menyempit bahkan menghilang.³²

Nefritis Interstitial merupakan jejas tubular yang manifestasi awalnya berupa edema tubulus proksimal dimana sel-sel epitel tubulus proksimal membengkak dengan sitoplasma yang granuler karena terjadi pergeseran air ekstraseluler ke intrasel.³² Pergeseran cairan ini terjadi karena toksin menyebabkan perubahan muatan listrik permukaan sel epitel tubulus, transport ion aktif dan asam organik, dan kemampuan mengkonsentrasikan dari ginjal yang akhirnya mengakibatkan tubulus rusak.⁹ Gambaran pembengkakan sel ini disebut degenerasi albuminosa yang merupakan bentuk degenerasi yang paling ringan serta bersifat reversibel.³⁴ Hal inilah yang mungkin menyebabkan lumen tubulus proksimal menyempit bahkan sampai menutup pada penelitian ini. Apabila jejas tubuler seperti di atas dibiarkan dan terus berlanjut akan diikuti dengan proses vasokonstriksi arterial proglomelurus yang dapat menyebabkan berbagai perubahan struktur dan fungsi dari sel epitel, degenerasi albuminosa hingga nekrosis yang bersifat ireversibel.³⁵

SIMPULAN

Ada perbedaan yang bermakna pada gambaran histologik ginjal tikus wistar antara kelompok yang diberi rosella (*Hibiscus sabdariffa*) dengan kelompok yang

tidak diberi rosella dan ada perbedaan yang bermakna pada gambaran histologik ginjal tikus wistar antar kelompok yang diberi rosella dengan dosis bertingkat.

SARAN

Perlu adanya penelitian sejenis dengan durasi penelitian yang lebih lama dan dosis yang lebih tinggi. Selain itu, perlu penelitian lanjutan untuk mengetahui komponen rosella (*Hibiscus Sabdariffa*) yang paling berperan terhadap kerusakan ginjal sekaligus mekanismenya. Pada penelitian berikutnya diharapkan dapat melakukan tehnik pengambilan dan pengolahan jaringan yang baik serta menghitung preparat sebanyak mungkin agar dapat mewakili kerusakan ginjal itu sendiri dan dapat meminimalkan kesalahan dalam menginterpretasikan data.

DAFTAR PUSTAKA

1. **Obat Herbal Tak Selalu Aman.** 2007 [cited 2009 Sept 28] Available from: URL: <http://202.146.5.33/ver1/Kesehatan/0709/15/143925.html>
2. Terapi Herbal Meski Alami, Waspada Efek Samping. 2005 [cited 2010 Feb 23] Available from URL: <http://www.suarakarya-online.com/news.html?id=120307>
3. Morton J. Roselle. 1987 [cited 2010 Feb 23] Available from: URL: <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/roselle.html>
4. Wibowo T. Pengaruh pemberian seduhan kelopak rosella (*Hibiscus sabdariffa*) terhadap kadar trigliserida darah tikus putih (*Rattus norvegicus*). [cited 2009 Sept 17] Available from: URL: www.digilib.uns.ac.id
5. Hirunpanich V, Utaipat A, Morales NP, Bunyaphatsara N, Sato H, Herunsalee A et al. Antioxidant effects of aqueous extracts from dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* Linn. (Roselle) in vitro using rat low-density lipoprotein (LDL). Biol Pharm Bull 2005; 28: 48. [cited 2010 Feb 23] Available from: URL: http://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/28/3/481/_pdf
6. Hasil Penelitian Teh Rosella. 2009 [cited 2010 Feb 23] Available from: URL: <http://tearosella.bogspot.com>
7. Apa ada efek samping the rosella. 2008 [cited 2010 Feb 23]. Available from: URL: <http://www.rosella-online.net/2008/05/apa-ada-efek-samping-teh-rosella.html>
8. Sisi lain obat herbal. 2008 [cited 2010 Feb 23]. Available from: URL: <http://rhamnosabulletin.wordpress.com/2008/01/16/sisi-lain-obat-herbal/>
9. Wijaya I, Miranti IP. Patologi Ginjal & Saluran Kemih. 3rd ed. Semarang: Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro: 2005. p. 49-53.

10. Kristiana L, Herti M. Khasiat dan Manfaat Rosella. Jakarta: PT.Agromedia Pustaka; 2008. p. 5
11. Manfaat Rosela Merah. 2007. [cited 2010 Feb 23]. Available from: URL: <http://sehatyuk.blogspot.com/2007/04/manfaat-rosela-merah.html>
12. Kustyawati ME, Ramli S : Pemanfaatan Hasil Tanaman Hias Rosella sebagai Bahan Minuman. 2008. [cited 2010 Feb 23] Available from: URL: <http://lemlit.unila.ac.id/file/arsip%202009/SATEK%202008/VERSI%20PDF/bidang%202008/VIII-13.pdf>
13. Dewani, Purbani Enny : Khasiat Rosella Merah Dalam Secangkit Teh. 2008. [cited 2010 Feb 23] Available from: URL: http://www.plantamedikaloka.com/index.php?option=com_content&task=view&id=12&Itemid=1
14. Fitriani V : Karena Merah Berkhasiat. 2008. [cited 2009 Sept 28] Available from: URL: <http://www.trubus-online.co.id>
15. Penelitian Rosela. 2008. [cited 2010 Feb 23]. Available from: URL: <http://www.naturindonesia.com/bunga-rosela/penelitian-rosela.html>
16. **Bunga Rosela Penghias Taman - Anti Hipertensi. 2007.** [cited 2010 Feb 23]. Available from: URL: <http://cybermed.cbn.net.id/cbprtl/cybermed/detail.aspx?x=Natural+Healing&y=cybermed|18|0|3|110>
17. Rosella Halau Hipertensi Sekuat Captopril. 2008. [cited 2010 Feb 23]. Available from: URL: <http://www.rosella-online.net/2008/04/rosella-halau-hipertensi-sekuat.html>
18. Teh Rosella Pacu Produksi Urine. 2009. [cited 2010 Feb 23]. Available from: URL: <http://www.klikdpdi.com/modules.php?name=News&file=article&sid=3685>
19. Snell RS. Anatomi Klinik untuk mahasiswa. 6th ed. Jakarta : EGC; 2006. P. 250-254

20. Di Fiore MSH. Ginjal: Korteks dan Sebuah Pyramid. In: Eroschenko VP, editor. Atlas Histologi Manusia. 9th ed. Jakarta: EGC; 2003.p.247
21. Soejoto. Sistem urin. In: Nurdjaman, Soejoto, Soetedjo, Faradz SMH, Witjahyo B, Susilaningsih N, dkk. Histologi II. Semarang: Balai Penerbit FK UNDIP; 2001.p. 70-89.
22. Nurdjaman, Soejoto, Faradz SMH, Witjahyo B, Susilaningsih N, dkk. Petunjuk praktikum histology, Jilid II. Semarang: Balai Penerbit FK UNDIP; 2004.p. 22
23. Guyton AC, Hall JE. Ginjal dan cairan tubuh. In: Setiawan I, editor. Buku ajar fisiologi kedokteran. 9th ed. Jakarta: EGC ; 1997. p. 375-437.
24. Urinary System. 2006. [cited 2010 Feb 23]. Available from: <http://www.ucc.ie/bluehist/CorePages/Urinary/urinary.htm>
25. The Urinary System. 2007. [cited 2010 Feb 23]. Available from: http://www.medicalhistology.us/twiki/pub/Main/ChapterSeventeenSlides/b68proximal_convoluted_tubule_kidney_40x_pas_labeled.jpg
26. **Gitawati R, Handayani RS:** Profil Konsumen Obat Tradisional Terhadap Ketanggapan Akan Adanya Efek Samping Obat Tradisional. 2008. [cited 2010 Feb 23]. Available from: URL: http://apotekputer.com/ma/index.php?option=com_content&task=view&id=139&Itemid=63
27. Hartono Andry. Prinsip Diet penyakit Ginjal, edisi IV. Jakarta : ARCAN, 1995. p. 1-10
28. World Health Organization. Research Guidelines For Evaluating The Safety And Efficacy Of Herbal Medicine Manila:World Health Organization Regional Office For The Western Pasific.1993:35
29. Chin, LK. Food Value of Roselle, *Hibiscus sabdariffa* Tea. 2008. [cited 2010 Feb 23]. Available from : http://www.suagcenter.com/documents/Hibiscus_Tea.pdf.

30. Estimating The Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. 2005. [cited 2010 Feb 23]. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM078932.pdf>
31. Robbins SL, Kumar V, Oswari J. editor. Buku Ajar Patologi II (Basic Pathology) Jakarta : 2007
32. Hathcock NJ. Vitamin and Mineral Safety. 2nd ed. CRN; 2004
33. Sarjadi, Patologi Umum. Ed 2. Semarang : Badan Penerbit Universitas Diponegoro ; 2003
34. Underwood JCE. Ginjal Dan Traktus Urinarius. In : Sarjadi, editor. Patologi Umum dan sistemik. 2nd ed. Jakarta : EGC; 1999