

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Penyakit ginjal kronis (PGK) merupakan masalah kesehatan global dengan angka morbiditas dan mortalitas yang meningkat setiap tahunnya. Pada tahun 2017 lebih dari 497 juta orang dewasa di dunia menderita PGK, dimana 236 juta menunjukkan PGK tahap 3-5. Pada tahun 2020, prevalensi global PGK mencapai 843,6 juta kasus. (Kovesdy, 2022) Penyakit ginjal stadium akhir membutuhkan terapi pengganti ginjal berupa hemodialisis (HD), dialisis peritoneal (PD), atau transplantasi ginjal yang meningkat 10-15% setiap tahunnya. (Meijers et al., 2018) Berdasarkan data dari Survei Kesehatan Indonesia Tahun 2023, prevalensi PGK di Indonesia mencapai 638.178 juta kasus. Prevalensi penyakit ginjal kronis di Provinsi Sulawesi Selatan yaitu 0,16% dengan prevalensi tertinggi pada usia 45 – 54 tahun.

Dengan menurunnya fungsi ginjal yang ditandai dengan penurunan laju filtrasi glomerulus (LFG), maka kemampuan ginjal untuk mengekskresikan *metabolic waste product* berkurang sehingga terjadi akumulasi khususnya turunan dari metabolisme nitrogen. *Metabolic waste product* yang terakumulasi disebut sebagai *uremic retention solutes (URS)*, dimana apabila *URS* tersebut kadarnya telah mencapai kadar toksik yang mengganggu fungsi sel, disebut sebagai toksin uremik. Semakin rendah LFG, semakin banyak akumulasi toksin uremik. Apabila toksin uremik ini

telah mengganggu fungsi organ, kondisi ini disebut sebagai sindrom uremik. Berdasarkan sumbernya, toksin uremik berasal dari : (1) produk metabolisme endogen, (2) komponen nutrisi yang diabsorpsi melalui saluran cerna (contohnya *advanced glycation end products*), (3) produk metabolisme dari fermentasi mikrobiota usus, yang disebut sebagai *gut-derived uremic toxins (GDUT)*. Berdasarkan sifat fisiko-kimianya, URS terbagi atas berat molekul rendah (seperti urea, kreatinin), berat molekul sedang (seperti β 2-microglobulin, adiponectin), dan zat terlarut yang terikat protein dengan berat molekul rendah (seperti indoxyl sulfat, p-cresyl sulfat). (Moradi et al., 2013)

Pada PGK, terjadi perubahan komposisi mikrobiota usus. Ada beberapa hipotesis yang dapat menjelaskan perubahan komposisi dan fungsi mikrobiota usus pasien PGK, seperti kondisi uremia, jenis diet, gangguan absorpsi protein, obat-obatan, waktu transit kolon yang memanjang, dan asidosis metabolik. (Ramezani et al., 2016) (Hobby et al., 2019) Kondisi ini menyebabkan terjadinya disbiosis mikrobiota usus yang ditandai dengan meningkatnya bakteri proteolitik sebagai pemecah protein seperti *Enterobacteriaceae*, *Clostridia*, *Bacteroidia*, *Pseudomonadaceae* dan menurunnya jumlah bakteri sakarolitik yang memiliki enzim pembentuk asam lemak rantai pendek (*short chain fatty acid = SCFA*) seperti *Bifidobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Prevotellaceae*. (Cheng et al., 2020)

Disbiosis mikrobiota usus pada PGK memproduksi komponen toksik seperti fenol, indol, dan amina. Indol sebagai prekursor toksin uremik

diproduksi oleh bakteri proteolitik di usus melalui proteolisis triptofan yang berasal dari diet protein hewani. Kemudian indol melalui proses hidrosilasi menjadi Indoksil Sulfat (IS) yang merupakan toksin uremik mayor yang berikatan dengan protein dan ekskresinya berkurang pada pasien PGK dan tidak dapat diekskresi melalui proses dialisis konvensional.(Yang & Tarng, 2018), (Hassan et al., 2022) Selain itu, disbiosis mikrobiota usus ini menyebabkan peningkatan bakteri yang memproduksi urea dan bakteri patogen yang merusak *epithelial tight junction* dan meningkatkan permeabilitas dinding usus sehingga toksin uremik, endotoksin, lipopolisakarida, dan sitokin pro inflamasi dapat melalui dinding usus masuk ke sirkulasi sistemik dan menginduksi inflamasi melalui jalur *gut-kidney axis*. Hal ini akan menyebabkan disfungsi endotel ginjal, fibrosis, dan kerusakan tubulus, yang selanjutnya mempercepat progresivitas PGK. (Jia et al., 2018),(Simões-Silva et al., 2018), (Sircana et al., 2019)

Penelitian oleh Wong dkk menunjukkan peningkatan jumlah famili bakteri *Clostridiaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Verrucomicrobaceae* berbanding lurus dengan peningkatan jumlah Indoxyl Sulfat (IS) dan P-Cresyl Sulfat (PCS) pada pasien PGK. (Wong et al., 2014). Dilaporkan bahwa IS yang merupakan hasil metabolisme bakteri usus bersifat nefrovaskuler toksik yang poten pada pasien PGK. (Hung et al., 2017) Peningkatan kadar toksin uremik (IS, PCS) berbanding lurus dengan kejadian inflamasi pada pasien PGK yang ditandai dengan tingginya kadar IL-6 dan *monocyte chemoattractant protein-1*.(Borges et al., 2016)

Beberapa modalitas terapi untuk mengurangi pembentukan toksin uremik oleh mikrobiota usus yaitu dengan diet rendah protein, diet tinggi serat, suplemen prebiotik, probiotik, ataupun sinbiotik, *oral adsorben*, serta dialisis. (Moradi et al., 2013), (Hassan et al., 2022)

Madu sebagai produk dari lebah diproduksi secara alami dengan jumlah yang berlimpah di Indonesia. Indonesia memiliki sekitar 40 jenis lebah trigona dimana sebagian besar bisa dikembangkan sebagai lebah penghasil madu. Madu mengandung glukosa, fruktosa, protein dan asam amino, vitamin, enzim, mineral dan komponen mikro lainnya seperti oligosakarida dan polifenol. Penelitian oleh Mohan menunjukkan bahwa madu mengandung oligosakarida yang merupakan prebiotik yang baik bagi pertumbuhan *Lactobacilli* dan *Bifidobacteria*. (Mohan et al., 2017) Oligosakarida yang diisolasi dari honeydew memiliki efek positif pada pertumbuhan *Bifidobacteria* dan *Lactobacilli* serta mengurangi jumlah *Bacteroides* dan *Clostridia*. (Rao et al., 2016) Penelitian oleh Tayebi-Khosroshahi dkk menunjukkan peningkatan jumlah *Bifidobacteria* dan *Lactobacillus* pada pasien PGK stadium 3-4 setelah pemberian laktulosa. (Tayebi et al., 2016) Penelitian lain oleh Sirich dkk menunjukkan pemberian prebiotik menurunkan secara signifikan kadar IS, PCS, dan hs-CRP. (Sirich et al., 2014)

Probiotik merupakan mikroorganisme yg diberikan dalam jumlah yang adekuat dan bermanfaat bagi host. Beberapa penelitian membuktikan madu mengandung beberapa bakteri yang menguntungkan. Penelitian oleh

Aina menunjukkan bahwa *Bacillus amyloliquefaciens* HTI-19 dan *Bacillus subtilis* HTI-23 yang diisolasi dari madu *Stingless Bee* (*Heterotrigona itama*) memiliki sifat probiotik. (Aina et al., 2020)

Sebuah penelitian pada 20 pasien PGK Setelah 2 minggu terapi dengan probiotik yang mengandung bakteri asam laktat *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria infantis*, dan *Enterococcus faecalis* menunjukkan hasil penurunan yang signifikan jumlah *Enterobacteria*, *Klebsiella*, dan *Clostridia perfringens*, p-cresol dan indol pada feses maupun serum. (Rukavina Mikusic et al., 2020) Beberapa penelitian melihat efek probiotik terhadap marker inflamasi pada pasien PGK menunjukkan hasil penurunan marker inflamasi seperti TNF- α , IL-5, IL-6, endotoksin, dan peningkatan IL-10. (Wang et al., 2012)

Beberapa tahun terakhir, polifenol tidak hanya berperan sebagai anti oksidan dan anti inflamasi tetapi juga berperan dalam modulasi mikrobiota usus. Penelitian telah menunjukkan bahwa polifenol dapat membantu menjaga kesehatan usus dengan mempromosikan perkembangan bakteri menguntungkan (*Lactobacilli* dan *Bifidobacteria*) sehingga menjaga keseimbangan mikrobiota usus dan menghambat bakteri patogen. (Buketov & Krasnen'Kyi, 2013) (Plata et al., 2019) Madu trigona mengandung polifenol, flavonoid, alkaloid dan triterpenoid yang lebih tinggi dibandingkan madu Apis. (Syamsul et al., 2021) Kandungan *catechins* menyebabkan kelimpahan dari *Bacteroides* dan penurunan jumlah bakteri *Clostridiaceae*.

Kandungan *Chlorogenic acid* menyebabkan kelimpahan mikrobiota usus seperti *Klebsiella* dan *Bifidobacterium*. (Bao, 2018).

Berdasarkan latar belakang tersebut, dapat disimpulkan bahwa keseimbangan mikrobiota usus berperan penting dalam mencegah peningkatan toksin uremik yang berasal dari fermentasi mikrobiota usus, dan madu mengandung komponen prebiotik, probiotik dan polifenol yang tinggi untuk mendukung pertumbuhan bakteri sakarolitik. Hingga saat ini belum ada penelitian yang meneliti tentang efek penggunaan madu trigona terhadap mikrobiota usus, kadar Indoxyl Sulfat, IL-6, dan progresivitas penyakit pada pasien PGK, sehingga peneliti tertarik untuk melakukannya.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, dapat dirumuskan pertanyaan penelitian sebagai berikut :

Bagaimana pengaruh pemberian Madu trigona terhadap jumlah *Bifidobacterium Sp.*, *Lactobacillus Sp.*, *Clostridium Sp.*, *Escherichia coli*, kadar Indoxyl Sulfat, IL-6, dan progresivitas penyakit pada pasien penyakit ginjal kronis ?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan Umum : Mengetahui pengaruh pemberian Madu trigona terhadap jumlah *Bifidobacterium Sp.*, *Lactobacillus Sp.*, *Clostridium Sp.*, *Escherichia*

coli, kadar Indoxyl Sulfat, IL-6, dan progresivitas penyakit sebelum dan setelah intervensi pada pasien penyakit ginjal kronis.

Tujuan Khusus :

1. Menilai besar perbedaan perubahan jumlah mikrobiota usus (*Bifidobacterium Sp.*, *Lactobacillus Sp.*, *Clostridium Sp.*, *Escherichia coli*) sebelum dan setelah intervensi pada pasien penyakit ginjal kronis yang diberikan Madu trigona dengan kelompok kontrol.
2. Menilai besar perbedaan perubahan kadar Indoxyl Sulfat sebelum dan setelah intervensi pada pasien penyakit ginjal kronis yang diberikan Madu trigona dengan kelompok kontrol.
3. Menilai besar perbedaan perubahan kadar IL-6 sebelum dan setelah intervensi pada pasien penyakit ginjal kronis yang diberikan Madu Trigona dengan kelompok kontrol.
4. Menilai besar perbedaan perubahan LFG dan rasio albumin kreatinin urin pada pasien penyakit ginjal kronis yang diberikan Madu Trigona dengan kelompok kontrol.

D. Manfaat Penelitian

1. Manfaat Pengembangan Ilmu

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang efektivitas Madu trigona terhadap perubahan jumlah *Bifidobacterium Sp.*,

Lactobacillus Sp., *Clostridium Sp.*, *Escherichia coli*, kadar Indoxyl Sulfat, Interleukin 6 (IL-6), dan progresivitas penyakit pada pasien PGK.

2. Manfaat Praktis

Hasil penelitian diharapkan bisa menambah sumber makanan prebiotik, probiotik dan polifenol untuk modifikasi mikrobiota usus pada pasien PGK.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan Umum Tentang Penyakit Ginjal Kronis

Penyakit ginjal kronis (PGK) adalah suatu keadaan abnormalitas struktur dan/atau fungsi ginjal selama lebih dari tiga bulan. Kriteria PGK adalah ditemukannya satu atau lebih petanda kerusakan ginjal yaitu albuminuria (ekskresi albumin urin ≥ 30 mg/24 jam; rasio albumin-kreatinin ≥ 30 mg/g atau ≥ 30 mg/mmol), abnormalitas sedimen urin, abnormalitas elektrolit dan abnormalitas lainnya terkait penyakit tubular, abnormalitas yang didapatkan dari pemeriksaan histopatologi, abnormalitas struktur yang dideteksi dari pemeriksaan pencitraan, riwayat transplantasi ginjal. Kriteria PGK juga didasarkan atas penurunan laju filtrasi glomerulus (LFG). Penurunan fungsi ginjal ini bersifat progresif dan irreversible. (Milik & Hryniewicz, 2014) Pada tahun 2017, prevalensi global PGK adalah 9,1%, yang mencapai 843,6 juta kasus. Sejak tahun 1990, prevalensinya PGK telah meningkat sebesar 29,3%. Pada umumnya pasien PGK stadium 1 sampai 3a tidak mengalami tanda dan gejala awal atau tidak mengalami gangguan keseimbangan cairan, elektrolit, endokrin dan metabolik. Sedangkan pasien PGK stadium 3b sampai 5 memperlihatkan beberapa gejala klinis. (Meijers et al., 2018)

Etiologi PGK terbanyak yaitu diabetes melitus dan hipertensi. Penyebab lain dapat mencakup glomerulonefritis, pielonefritis, penyakit ginjal polikistik, neoplasma, penyakit sistemik (sistemik lupus eritematosus dan vasculitis), dan lainnya. (Sampaio-Maia et al., 2016) Menurut *Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO)* 2024, PGK diklasifikasikan berdasarkan penyebab, LFG, dan albuminuria. Dilihat dari etiologi, klasifikasi PGK berdasarkan ada atau tidaknya penyakit sistemik dan lokasi ginjal yang mengalami kelainan anatomi maupun patologi. Berdasarkan LFG, PGK terdiri atas lima stadium yaitu :

Tabel 1. Stadium Penyakit Ginjal Kronik berdasarkan laju filtrasi glomerulus

Stadium	Penjelasan	LFG (mL/min/1.73m ²)
1	Kerusakan ginjal dengan LFG normal atau meningkat	≥ 90
2	Kerusakan ginjal dengan penurunan LFG ringan	60-89
3a	Kerusakan ginjal dengan penurunan LFG ringan sampai sedang	45-59
3b	Kerusakan ginjal dengan penurunan LFG sedang hingga berat	30-44
4	Kerusakan ginjal dengan penurunan LFG berat	15-29
5	Gagal ginjal	<15

Sumber : (KDIGO, 2024)

Sedangkan klasifikasi PGK berdasarkan albuminuria kategori *Albumin excretion rate (AER)* dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Klasifikasi PGK berdasarkan *Albumin excretion rate*

Kategori	AER	ACR (mg/mmol)		Keterangan
	(mg/24 jam)	(mg/mmol)	(mg/g)	
A1	< 30	<3	<30	Normal-peningkatan ringan
A2	30-300	3-30	30-300	Peningkatan sedang
A3	>300	>30	>300	Peningkatan berat

Sumber : (KDIGO, 2024)

Patofisiologi PGK tergantung pada penyakit yang mendasarinya. Berkurangnya massa ginjal mengakibatkan hipertrofi struktural dan fungsional nefron yang masih tersisa sebagai upaya kompensasi, yang diperantarai oleh molekul vasoaktif seperti sitokin dan *growth factor*. Hal ini menyebabkan terjadinya hiperfiltrasi, yang diikuti oleh peningkatan tekanan kapiler dan aliran darah glomerulus. Proses adaptasi ini berlangsung singkat, akhirnya diikuti oleh proses maladaptasi berupa sklerosis nefron yang masih tersisa. Proses ini akhirnya diikuti dengan penurunan fungsi nefron yang progresif. Adanya peningkatan aktivitas aksis *renin angiotensin aldosterone system (RAAS)* ikut memberikan kontribusi terhadap terjadinya hiperfiltrasi, sklerosis dan progresifitas tersebut. Aktivasi jangka panjang aksis *RAAS*, Sebagian diperantarai oleh *growth factor* seperti *transforming growth factor β (TGF- β)*. (Agarwal & Nath, 2019)

Gejala dan komplikasi yang ditimbulkan, baik komplikasi jangka menengah dan jangka panjang berhubungan dengan akumulasi toksin uremik dalam tubuh dan berkaitan erat dengan tingkat bersihan toksin uremik. Toksin uremik merupakan penyebab utama dari sindrom uremik,

gangguan metabolisme, dan komplikasi uremik. Selain urea nitrogen dan kreatinin, substansi molekul menengah dan besar, molekul kecil yang terikat protein, asam amino rantai pendek dan sitokin juga berperan dalam proses patologis untuk terjadinya komplikasi pada pasien PGK. (Wu et al., 2019)

Ada banyak faktor yang berperan dalam inflamasi kronik pada PGK, diantaranya peningkatan produksi sitokin pro-inflamasi, stres oksidatif dan asidosis, infeksi kronis dan berulang, perubahan metabolisme jaringan adiposa, dan disbiosis usus. Inflamasi sistemik selalu disertai dengan stres oksidatif. Dengan mengaktifkan faktor transkripsi, NF- κ B dan dengan mempromosikan pembentukan lipoprotein teroksidasi dan produk glikoksidasi, stres oksidatif memicu inflamasi. Sebaliknya inflamasi menyebabkan stres oksidatif, nitrogen dan spesies halogen oleh sel imun yang diaktifkan. (Ferreira et al., 2014)

Deteksi dini PGK menyebabkan penurunan morbiditas dan mortalitas, hal ini dikarenakan tatalaksana dapat dimulai lebih awal. Penatalaksanaan yang dilakukan bertujuan untuk menghambat progresivitas PGK dengan cara mengontrol etiologi yang mendasari PGK sesuai dengan target dan diet rendah protein sesuai dengan tahapan penurunan fungsi ginjal. (KDIGO, 2024)

Diet ini diberikan kepada pasien yang mengalami penurunan fungsi ginjal. Terapi diet rendah protein pada pasien PGK dapat menurunkan akumulasi *wasting product* yang tidak dapat diekskresikan oleh ginjal

sehingga mampu mengurangi gejala uremia. Di sisi lain pembatasan protein yang terlalu ketat akan berdampak pada risiko malnutrisi. Intervensi diet pada PGK meliputi pengaturan asupan protein, energi, fosfat, sodium, potassium, kalsium, pengaturan intake cairan, vitamin dan mineral. Asupan nutrisi tergantung dari stadium PGK dan pada pasien yang menjalani dialisis tergantung dari jenis dialisis yang dijalani (Tabel 3).

Tabel 3 Asupan Nutrisi Berdasarkan Stadium PGK

Nutrisi	Stadium 1-4	Hemodialisis	Peritoneal Dialisis
Protein	• LFG >30 mL/min/1.73 m² : ≥ 0.8 g/kg/hari • LFG 15-29 mL/min/1.73 m² : 0.6-0.75 g/kg/hari • Sindrom Nefrotik : 0.8-1.0 g/kg/hari	≥ 1.2 g/kg/hari dengan paling sedikit 50% HBV	≥ 1.2 -1.3 g/kg/hari paling sedikit 50% HBV
Energi (jika pasien $<90\%$ atau $>115\%$ dari rata-rata BB standar, gunakan aBWef)	35-40 kkal/kg, tergantung status nutrisi dan faktor stres	≥ 60 tahun: 30-35 kkal/kg <60 tahun : 35 kkal/kg	≥ 60 tahun : 30-35 kkal/kg termasuk kalori dialisat <60 tahun: 35 kkal/kg termasuk kalori dialisat
Fosfat	10-20 mg/g protein atau 600-800 mg/hari	900 mg/hari atau <17 mg/kg/hari	900 mg/hari atau <17 mg/kg/hari
Sodium	Bervariasi menurut penyebab PGK; biasanya “no added salt” (i.e., 2-4 g/hari)	2000-3000 mg/hari (88-130 mmol/hari)	Tergantung pemeriksaan fisik CAPD dan APD, 3000-4000 mg/hari (130- 175 mmol/hari)

Potassium	Biasanya tidak dilarang sampai LFG <10 mL/min/1.73 m ²	40 mg/kg atau kira-kira 2000- 3000 mg/hari (50- 80 mmol/hari)	Tidak dilarang pada CAPD and APD: kira- kira 3000- 4000 mg/hari (80-105 mmol/hari) kecuali serum level meningkat atau menurun
Cairan	Berdasarkan status klinis	500-1000 mL/hari ditambah jumlah urin perhari	CAPD dan APD, kira- kira 2000-3000 mL/hari berdasarkan status klinis; tidak dilarang jika BB dan TD terkontrol dan sisa fungsi ginjal 2-3 L/hari
Calcium	800 mg/hari atau bila perlu untuk menjaga target level serum	Sama seperti PGK stadium 1-4	Sama seperti PGK stadium 1-4
Vitamin dan mineral	RDA untuk vitamin B complex dan C; zinc, iron, calcium, and vitamin D	Vitamin C, 60-100 mg; vitamin B6, 5- 10 mg; folic acid, 0.8-1 mg; DRI for others; individualize zinc, calcium, iron, and vitamin D	Sama seperti hemodialysis

aBWef, Adjusted edema-free body weight; APD, automated peritoneal dialysis; CAPD, continuous ambulatory peritoneal dialysis; PGK, penyakit ginjal kronik; DRI, dietary reference intake; LFG : Laju Filtrasi Glomerulus; HBV, high biologic value; NAS, no added salt; RDA, recommended dietary allowance.

Sumber : (Fuchs, lapierre, 2014)

Terapi diet rendah protein dapat membantu mengurangi akumulasi toksin uremik, sehingga mengurangi gejala uremik, proteinuria, dan menunda penggunaan terapi pengganti ginjal. Perubahan pola makan protein penderita PGK dapat dibagi menjadi:

- 1) Kandungan protein sangat rendah, kurang dari 0,3 g/kg BB;
- 2) Diet rendah protein, 0,6-0,8 g/kg BB dan
- 3) Diet protein normal, 1-1,2 g/kg BB

Dalam berbagai penelitian prospektif, diet sangat rendah protein dapat menurunkan perkembangan PGK, namun pasien berisiko lebih tinggi mengalami malnutrisi. Kapan sebaiknya diet rendah protein dimulai pada PGK masih menjadi perdebatan. Ambang batas LFG untuk memulai diet rendah protein belum ditetapkan. Kebanyakan ahli nefrologi merekomendasikan memulai diet rendah protein berdasarkan estimasi LFG. (Baragetti et al., 2020)

Tabel 4 Rekomendasi Asupan Protein Berdasarkan Stadium PGK

Stadium PGK	LFG	Asupan Protein g/kgbb/hari	Catatan
1	>90	Normal 1.0-1.2	Garam, Lemak, Energi, Serat
2	60-89	Normal 1.0-1.2	Garam, Lemak, Energi, Serat
3a	45-59	Rendah-normal 0.8	Garam, Lemak, Energi, Serat
3b	30-44	Rendah protein 0.6-0.7	Garam, Lemak, Energi, Serat perhatikan fosfat
4	15-29	Rendah protein 0.6-0.7	Garam, Lemak, energi, Serat perhatikan fosfat ketoanalog
5	<15	rendah protein max. 0.3-0.6	Garam, Lemak, Energi, Serat Perhatikan fosfat ketoanalog

Sumber : (Baragetti et al., 2020)

B. Tinjauan Umum Tentang Mikrobiota Usus Pada Penyakit Ginjal Kronik

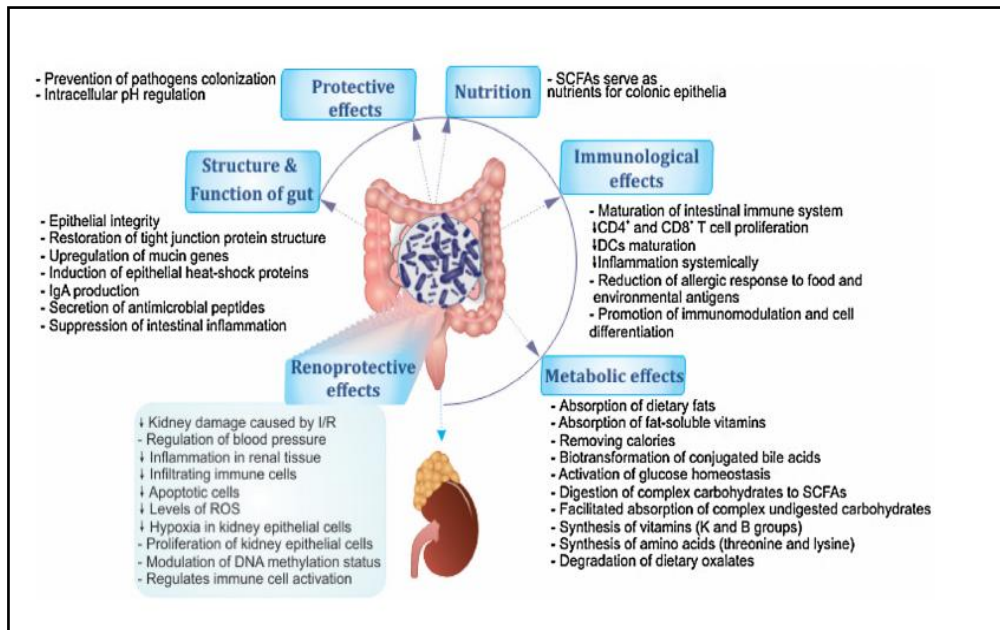
Traktus gastrointestinal mengandung 10^{12-14} bakteri. (Hobby et al., 2019) Populasi mikroorganisme usus memiliki beberapa filum, termasuk *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Cyanobacteria*, *Fusobacteria* dan *Spirochaetes*. Filum yang terbanyak yaitu bakteri *Firmicutes* (*Ruminococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium* dan *Roseburia*) dan bakteri *Bacteroidetes* (*Bacteroides*, *Prevotella* dan *Xylanibacter*) yang mencapai 90% dari total spesies bakteri. Sekitar 70% mikrobiota usus berada di kolon dengan kerapatan 10^{11} sel/ml². Kolonisasi yang besar tersebut disebabkan oleh luasnya permukaan kolon yang kaya akan molekul-molekul sehingga dapat digunakan sebagai nutrisi untuk pertumbuhan berbagai mikrobiota. Keseimbangan antara filum ini penting untuk menjaga komposisi dan fungsi mikrobiota usus yang dapat diubah oleh faktor-faktor seperti gaya hidup, stres, antibiotik, alkohol dan nutrisi. (Sabatino et al., 2015)(Hobby et al., 2019)

Dalam kondisi fisiologis (eubiosis), mikrobiota usus mempengaruhi homeostasis *host* dengan berkontribusi pada fungsi metabolisme, nutrisi dan imunitas. Beberapa efek fisiologis mikrobiota usus yaitu :(Sabatino et al., 2015)

1. Menjaga integritas dan fungsi traktus gastrointestinal
 - a. Memperbaiki struktur protein *tight junction*

- b. Menginduksi *epithelial heat-shock protein*
 - c. Meningkatkan regulasi sekresi musin
 - d. Meningkatkan ikatan dengan sel epitel intestinal
 - e. Mensekresi peptida antimikroba
 - f. Mensupresi inflamasi usus
2. Efek imunologis
- a. Pematangan sistem inflamasi intestinal
 - b. Mengurangi respon alergi terhadap makanan dan antigen
 - c. Mempromosi imunomodulasi dan diferensiasi sel
3. Efek metabolik
- a. Membantu metabolisme polisakarida yang berasal dari tumbuhan yang tidak dapat dicerna dan *resistant starch*
 - b. Memfasilitasi penyerapan karbohidrat kompleks
 - c. Mensintesis vitamin (K dan B)
 - d. Mensintesis asam amino
 - e. Biotransformasi asam empedu terkonjugasi

f. Mendegradasi oksalat yang bersumber dari makanan



Gambar 1. Efek mikrobiota usus pada manusia sehat (Mahmoodpoor et al., 2017)

Di usus, beberapa mikroba termasuk kelompok *Lactobacillus* dan *Actinobacteria* (*Bifidobacterium Sp.*) bekerja sama untuk fermentasi serat, polisakarida dan oligosakarida menghasilkan produksi asam lemak rantai pendek (SCFA). Selain perannya dalam pencernaan makanan, mikrobiota usus memainkan peran kunci dalam sinyal neurologis, menciptakan resistensi terhadap invasi patogen usus, membantu mengatur motilitas saluran pencernaan, memodulasi respon imunologi, fungsi endokrin, biosintesis vitamin, dan metabolisme garam empedu, obat-obatan eksogen dan toksin. (Felizardo et al., 2019), (Sircana et al., 2019)

Pada subyek sehat, pencegahan lewatnya zat dan mikroba dari lumen usus ke aliran darah akibat adanya *barrier intestinal*, dengan struktur

/ sistem pelindungnya yang terdiri dari *tight junction*, membran enterosit, sekresi mukus dan mekanisme imunologi di dinding usus. *Tight junction* disusun oleh sekelompok protein seperti occludins dan claudins yang berperan pada proses difusi zat terlarut dan cairan. Zonula occludens (ZO) dan cincin *peri-junctional* aktin dan miosin berperan mengatur permeabilitas paraseluler. *Tight junction* berperan terhadap translokasi mikroba, lipopolisakarida (LPS), produk toksik sebagai hasil akhir fermentasi bakteri, enzim pencernaan dan zat berbahaya lainnya yang berisiko mengalami translokasi dari traktus gastrointestinal ke lingkungan internal. (Meijers et al., 2019)

Ketersediaan karbohidrat dan protein dalam lumen usus berperan dalam metabolisme bakteri anaerobik, yaitu proses fermentasi. karbohidrat adalah nutrisi terpenting yang digunakan oleh metabolisme mikrobiota kolon untuk produksi energi, dengan metana, hidrogen, dan *short chain fatty acid* (SCFA) sebagai produk akhir. *Short chain fatty acid* terdiri atas asetat, butirat, dan propionat yang merupakan substrat energi utama untuk sel epitel kolon dan menjaga integritas dari fungsi epitel barrier dengan meregulasi *protein tight junction*. (Sumida & Kovesdy, 2019)

Short chain fatty acid dapat melindungi epitel usus dengan meningkatkan modulasi respon imun pejamu melalui dua mekanisme utama signaling SCFA: penghambatan *histone deacetylases* (HDACs) dan aktivasi *G protein-coupled receptors* (GPRs). *Histone deacetylases* adalah

enzim yang mencegah transkripsi DNA sehingga mengatur ekspresi gen. Penghambatan *HDAC* dalam kolonosit dan sel imun mukosa oleh *SCFA* dapat menyebabkan penekanan *nuclear factor-kappa beta (NF-κB)* di beberapa jenis sel dalam sistem imun mukosa sehingga mempengaruhi transkripsi gen terkait inflamasi, termasuk gen yang mengkode untuk sitokin proinflamasi misalnya, *interleukin-6 (IL-6)* dan *tumor necrosis factor-alpha (TNF-α)*. *G protein-coupled receptors (GPRs)*, khususnya GPR43, GPR41, dan GPR109A, telah diidentifikasi sebagai reseptor kolon untuk *SCFA* dan berperan dalam proses regulasi inflamasi melalui penekanan ekspresi NF-κβ dan mempromosikan diferensiasi sel T regulator kolon. (Sumida & Kovesdy, 2019)

Mikrobiota usus secara langsung berperan dalam respon inflamasi host melalui interaksinya dengan mukus dan barrier epitel dari mukosa usus dan sel imun. Bakteri probiotik dan komensal mencegah perkembangan inflamasi lokal dan sistemik akibat dari masuknya lipopolisakarida (LPS) ke dalam sirkulasi melewati fungsi barrier usus melalui berbagai mekanisme. (Ferreira et al., 2014)

Karbohidrat dan protein berperan dalam pertumbuhan bakteri sakarolitik (*Bifidobacterium* dan *Lactobacillus*). Pada kondisi karbohidrat berkurang, protein difermentasi oleh bakteri proteolitik (*Clostridium* dan *Bacteroides*) untuk menghasilkan energi melalui deaminasi. Namun, jalur fermentasi protein juga berpotensi menghasilkan toksin metabolit (amonia,

amina, tiol, fenol, dan indol), yang umumnya diekskresikan melalui feses dan ginjal normal.(Lau et al., 2018)

Ada beberapa hipotesis yang dapat menjelaskan ketidakseimbangan mikrobiota usus pada pasien PGK, seperti: (Pan & Kang, 2018)

1. Peningkatan masuknya urea dari aliran darah ke lumen usus dapat mengubah profil mikrobiota usus (peningkatan bakteri urease) untuk menghasilkan ammonia dan peningkatan enzim pembentuk indol dan p-cresyl sulfat yang menyebabkan peningkatan produksi molekul yang terikat protein melalui fermentasi protein, seperti indoxyl sulfate (IS), p-cresyl sulfat (PCS) dan indole-3-acetic acid (IAA) dan penurunan SCFA.
2. Paparan berbagai faktor pada penyakit seperti diet rendah serat, malnutrisi, edema, konstipasi dan stress oksidatif, yang dapat mengurangi aliran darah usus dan waktu transit di usus besar, sehingga memicu atrofi barrier usus dan meningkatkan permeabilitas barrier usus.

Pada penyakit ginjal kronik, penurunan keragaman flora usus dan peningkatan kelimpahan bakteri aerob usus, seperti *Enterobacteriaceae* dan *Escherichia coli* (*E. Coli*) mengakibatkan ekosistem usus yang tidak seimbang sehingga toksin uremik terikat protein melalui proses proteolisis akan meningkat di usus. Analisis sampel feses dari pasien PGK menunjukkan bahwa senyawa fenolik terutama diproduksi oleh bakteri

aerob dan anaerob, sedangkan senyawa indol diproduksi oleh bakteri anerob. (Cheng et al., 2020) Penelitian menunjukkan bahwa pasien PGK mengalami perubahan yang signifikan dari mikrobiota usus, dengan peningkatan jumlah bakteri aerob dan anaerob dibanding kontrol sehat. Didapatkan jumlah *Enterobacteriaceae* (terutama *Enterobacter*, *Klebsiella*, dan *Escherichia*), *Enterococci*, dan *Clostridium perfringens* secara signifikan lebih tinggi pada feses pasien dengan *ESRD* dibandingkan kontrol yang sehat. (Sumida & Kovesdy, 2019) Penelitian pada PGK stadium 3, 4, dan stadium 5 yang menjalani dialisis menunjukkan penurunan jumlah *Bifidobacterium Sp.*, *Lactobacillus Sp.*, dan peningkatan *Enterobacteriaceae* khususnya genus *Enterobacter*, dan *Klebsiella*. (Sampaio-Maia et al., 2016) Pada pasien PGK ditandai dengan menurunnya jumlah bakteri dari famili *Bifidobacteriaceae*, terutama *Bifidobacterium*, *Lactobacillaceae*, *Bacteroidaceae* dan *Prevotellaceae* dan meningkatnya jumlah bakteri *Enterobacteriaceae*, khususnya *Enterobacter*, *Klebsiella* dan *Escherichia*, *Enterococcus*, dan *Clostridium perfringes*. (Sircana et al., 2019), (Rukavina Mikusic et al., 2020)

Beberapa faktor yang berperan dalam perubahan mikrobiota usus pada pasien PGK, seperti peningkatan konsentrasi urea di cairan intraselular dan ekstraselular menyebabkan influx urea ke traktus gastrointestinal (difusi pasif). Asam urat yang merupakan metabolisme akhir dari purin, yang normalnya diproses di ginjal dan dieksresi ke urin pada pasien PGK dieksresi melalui kolon bersama oksalat. Diet pada pasien

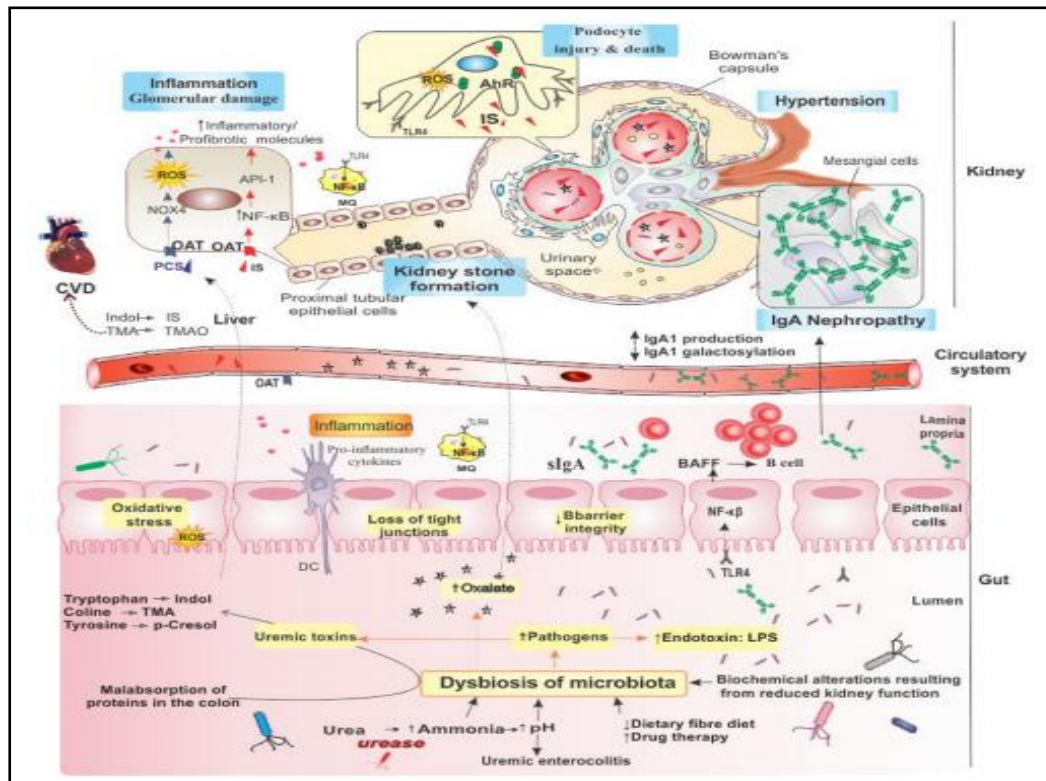
PGK, dianjurkan membatasi jumlah buah-buahan, sayuran dan produk tinggi serat yang kaya akan kalium dan oksalat. Ketika ketersediaan karbohidrat sebagai sumber nutrisi utama berkurang, fermentasi protein akan meningkat oleh bakteri proteolitik seperti *Clostridium* dan *Bacteroides* untuk menghasilkan energi (melalui proses deaminasi). Fermentasi protein ini akan meningkatkan metabolit toksik seperti ammonia, fenol, indol. Pada tahap akhir, pasien PGK membutuhkan akses arteriovenous dan terjadi risiko infeksi sehingga membutuhkan antibiotik. Kondisi lain yaitu penggunaan agen pengikat fosfat meningkat. Hal ini yang menyebabkan perubahan komposisi mikrobiota usus. (F. X. Li et al., 2019)

Enzim urease yang dihasilkan oleh mikrobiota tertentu seperti *Enterobacteriaceae* yang menghidrolisis urea di usus, menyebabkan pembentukan amonium hidroksida. Jumlah amonium hidroksida yang tinggi kemudian bisa menyebabkan peningkatan pH sehingga *tight junction* epitel usus terganggu, ditandai dengan berkurangnya protein occludin, claudin-1, dan zonula occludens. Peningkatan permeabilitas usus, pada gilirannya memungkinkan translokasi toksin, fragmen bakteri, dan bakteri utuh melalui dinding usus ke sirkulasi sistemik, dan dianggap sebagai penyumbang terbesar aktivasi respon inflamasi dan berpotensi menyebabkan morbiditas dan mortalitas pada pasien PGK. (Sumida & Kovesdy, 2019)

Produk yang dihasilkan oleh bakteri usus, terutama lipopolisakarida (LPS) masuk ke aliran darah. Ketika LPS berikatan dengan TLR4 pada

makrofag dan monosit akan menyebabkan aktivasi faktor proinflamasi (termasuk sitokin, seperti IL-1 dan IL-6, TNF- α dan kemokin) melalui *nuclear factors*, seperti NF- $\kappa\beta$, protein activator-1 dan interferon sehingga meningkatkan kerusakan endotel melalui *reactive oxygen species (ROS)*. Peningkatan produksi ROS yang meningkatkan reaksi antara LPS dan TLR4 membentuk lingkaran setan antara inflamasi dan stres oksidatif (Gambar 2). Penelitian menunjukkan bahwa endotoksemia memiliki berbagai efek negatif pada sistem kardiovaskuler, stres oksidatif, dan aterosklerosis. Bahkan, dilaporkan bahwa endotoksemia berkorelasi dengan risiko mortalitas pada pasien PGK dan hemodialisis. (Mahmoodpoor et al., 2017)

Terjadinya disbiosis akan meningkatkan pembentukan toksin uremik sebagai efek samping fermentasi protein seperti amonia, indol, dan p-cresol serta menurunnya produksi SCFA. Toksin uremik ini akan dikonjugasi di hati menjadi urea, indoxyl sulfat dan p-cresyl sulfat yang kemudian ikut aliran darah sistemik. Di ginjal yang telah mengalami kerusakan sebelumnya oleh berbagai penyebab mengakibatkan toksin uremik ini tidak dapat dikeluarkan. (Felizardo et al., 2019)



Gambar 2. Patogenesis hubungan antara mikrobiota usus dengan penyakit ginjal kronik (Mahmoodpoor et al., 2017)

C. Tinjauan tentang *Bifidobacterium Sp.*, dan *Lactobacillus Sp.*

Telah diketahui sejak lama bahwa *Bifidobacterium Sp.* dan *Lactobacillus Sp.* berkolonisasi di usus manusia dan berperan melindungi dari bakteri patogen gram negatif dan bakteri anaerob fakultatif. Bakteri menguntungkan ini berperan mencegah bakteri gram negatif dan anaerob fakultatif menempel pada enterosit (peran ini sering dikenal sebagai resistensi kolonisasi) dan membatasi pertumbuhan serta penyebarannya. *Bifidobacterium Sp.* dan *Lactobacillus Sp.* merupakan bakteri sakrolitik yang memfermentasi oligosakarida yang tidak dapat dicerna sehingga menghasilkan SCFA. Umumnya, *Bifidobacteria Sp.* dicirikan dengan

memproduksi asetat setelah fermentasi glukosa dan fruktosa, memfermentasi dan kolonisasi musin untuk mendapatkan energi. Sedangkan *Lactobacillus Sp.* menjaga barrier epitel, mengsekresi musin, meningkatkan fungsi *tight junction*, meningkatkan sitoprotektif *heat shock proteins*, dan mencegah apoptosis sel epitel. Faktanya, diketahui bahwa bakteri usus, terutama bakteri anaerob fakultatif, menempel dan menyerang sel epitel usus dan lebih tahan terhadap proses fagositosis jika dibandingkan dengan bakteri lain seperti bakteri anaerob. Oleh karena itu, dengan mengurangi jumlah bakteri anaerob fakultatif di usus, *Bifidobacterium Sp.* dan *Lactobacillus Sp.* membantu mengurangi translokasi bakteri oportunistik melalui epitel usus. (Sampaio-Maia et al., 2016), (Mohan et al., 2017)

Bifidobacterium Sp. adalah bakteri gram positif, nonmotil, anaerobik yang menghuni saluran pencernaan dan sebagian kecil saluran kemih pada manusia dan mamalia lainnya. *Bifidobacteria* adalah salah satu genus utama bakteri yang ada di usus besar dan sering digunakan sebagai probiotik. Banyak spesies dan galur *Bifidobacteria* bertanggung jawab atas berbagai efek menguntungkan dalam tubuh manusia terutama di usus, seperti penghambatan pertumbuhan patogen, kompetisi untuk nutrisi, sumber energi dan habitat pada mukosa usus sehingga berkontribusi pada pemeliharaan keseimbangan dan keragaman mikroba, regulasi respon imun, mengurangi aktivitas enzimatis yang disebabkan oleh beberapa mikroba, konversi beberapa makanan menjadi molekul bioaktif, dan

produksi vitamin dan bioproduct lain yang berguna bagi tubuh manusia.(Sampaio-Maia et al., 2016)

Lactobacillus Sp. adalah bakteri gram positif berbentuk batang, anaerob fakultatif yang mampu memfermentasi glukosa dan gula lainnya terutama menjadi asam laktat (metabolisme homofermentatif) atau menjadi asam laktat, karbon dioksida, dan etanol (metabolisme heterofermentatif). Seperti dijelaskan di atas untuk *Bifidobacteria*, *Lactobacillus* juga dapat mengembalikan keseimbangan fisiologis dan mikroba dalam tubuh manusia. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa *Lactobacillus* menghasilkan senyawa dengan berat molekul rendah yang mampu menghambat mikroorganisme dan melindungi epitel usus. Selain itu, *Lactobacillus* dapat mempertahankan lingkungan asam sehingga membatasi pertumbuhan mikroorganisme lain dan mampu menghasilkan hidrogen peroksida seperti piruvat oksidase, oksidase laktat, dan NADPH oksidase. Berkurangnya jumlah *Bifidobacteria* dan *Lactobacillus* di usus pasien PGK memungkinkan pertumbuhan berlebih dari patogen dan terjadinya translokasi mikroorganisme usus melalui barrier epitel usus.(Sampaio-Maia et al., 2016)

D. Tinjauan Umum Tentang *Clostridium Sp.*

Clostridium merupakan salah satu genus dari filum Firmicutes dan jumlahnya mencapai 95%. Genus *Clostridium Sp.* merupakan salah satu

genus dari bakteri gram positif, bersifat merugikan dan bisa ditemukan pada intestinal manusia. (Mohan et al., 2017). Anggota filum Firmicutes terutama *Clostridium subcluster XIVa* berubah secara kuantitatif dan kualitatif dalam mikrobiota usus pasien *End Stage Renal Disease (ESRD)* dan PGK. (Sircana et al., 2019) Fermentasi protein dan asam amino oleh bakteri proteolitik misalnya genus *Clostridium Sp.*, melepaskan metabolit yang toksik seperti amonia, amina, hidrogen sulfida, dan senyawa fenol serta indol.(Mohan et al., 2017)

Sifat merugikan dari *Clostridium Sp.* bisa dicegah dengan mengurangi jumlah pertumbuhannya. Madu salah satu zat yang bisa menghambat pertumbuhan bakteri tersebut. Madu mengandung fruktooligosakarida yang pada beberapa penelitian terbukti bisa menghambat pertumbuhan *Clostridium Sp.* Sebuah penelitian in vitro yang melakukan kultur terhadap *Clostridium perfringens*, didapatkan hasil bahwa madu menghambat pertumbuhan *Clostridium perfringens*(Shin & Ustunol, 2005)

E. Tinjauan Umum Tentang *Enterobacteriaceae (E. coli)*

Enterobacteriaceae adalah bakteri gram negatif, fakultatif anaerob, berbentuk batang yang tidak membentuk spora. Famili *Enterobacteriaceae* memiliki flagela untuk motilitas, reaksi katalase dan umumnya kekurangan sitokrom C oksidase. Bakteri ini memiliki jalur metabolisme yang sangat beragam: dapat memfermentasi gula untuk menghasilkan asam laktat dan

berbagai produk lainnya, juga dikenal sebagai bakteri pereduksi sulfat yang menggunakan hidrogen, dengan banyak spesies yang mampu mereduksi nitrat menjadi nitrit. Sebagai bakteri gram negatif, *Enterobacteria* menghasilkan endotoksin yang bertanggung jawab untuk proses inflamasi dan vasodilatasi dalam tubuh manusia ketika dilepaskan ke aliran darah. Famili ini sangat beragam dengan individu yang biasa ditemukan di lingkungan (tanah, air, tumbuhan) dan biasanya disebut “bakteri enterik”, karena beberapa anggota famili ini tumbuh dan hidup di usus manusia dan hewan.(Sampaio-Maia et al., 2016)

Enterobacteriaceae mencakup banyak simbion yang tidak berbahaya dan relevan patogen, seperti *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enterica*, *Serratia marcescens*, *Shigella dysenteriae*, dan *Yersinia pestis*. Dalam lumen usus, beberapa anggota *Enterobacteriaceae* dianggap patogen karena bersifat kompetitif dan kemampuannya untuk menempel dan menyerang jaringan host. Dengan demikian, pertumbuhan berlebih *Enterobacteriaceae* dalam usus pasien PGK dapat meningkatkan perubahan metabolisme dalam lumen usus dan sebagai bakteri patogen. Selain itu, sebagai bakteri gram negatif, translokasinya ke darah dapat menyebabkan peningkatan risiko endotoksemia.(Sampaio-Maia et al., 2016)

F. Tinjauan Umum Tentang Toksin Uremik (Indoxyl Sulfat)

Klasifikasi yang digunakan untuk *uremic retention solutes* (URS) berdasarkan pada ikatan terhadap protein dan berat molekul. *Uremic Retention Solutes* terbagi atas : (Liu et al., 2018), (Vanholder et al., 2018)

1. Berat molekul rendah, bila kurang dari 500 Dalton (Da) dan dapat dihilangkan melalui dialisis. Contohnya seperti urea, kreatinin, asymmetric dimethylarginine (ADMA), trimethylamine-N-oxide (TMAO), dan asam urat.
2. Berat molekul sedang, bila lebih besar dari 500 Dalton (Da) dan membutuhkan *high flux* membran dialisis, yang memiliki kapasitas transpor lebih besar dan ukuran pori yang lebih besar. Contohnya seperti β 2 -microglobulin dan adiponektin.
3. Zat terlarut yang terikat protein dengan berat molekul kurang dari 500 Dalton (Da). Karakteristik zat ini yaitu walaupun ukurannya kurang dari 500 Da, tetapi tidak dapat dihilangkan melalui proses dialisis akibat dari ikatan proteinnya. Contohnya seperti indoxyl sulfat dan p-cresyl sulfat.

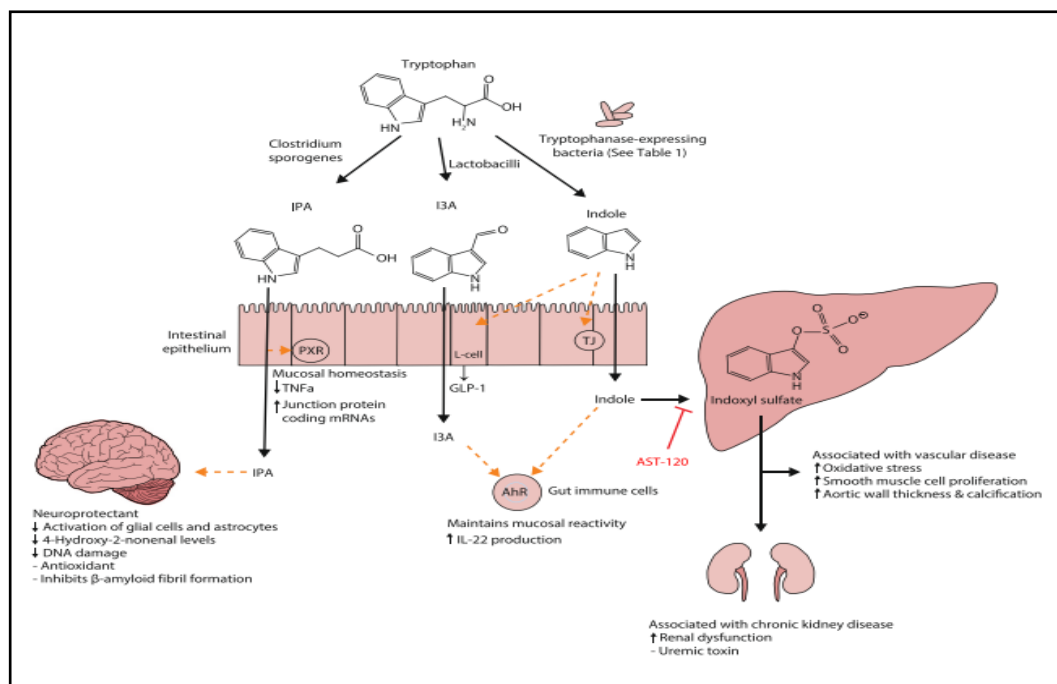
Triptofan adalah asam amino esensial yang ditemukan dalam berbagai jenis makanan seperti daging merah, ikan dan telur. Bakteri komensal mengekspresikan triptofanase untuk mengkatabolisme triptofan menjadi indol dengan bantuan bakteri intestinal seperti *Escherichia coli*. *Lactobacillus Sp.* mengkonversi triptofan ke indole-3-aldehyde (I3A). *Clostridium sporogenes* mengubah triptofan menjadi Indole-3-propionate

(IPA) melalui deaminase triptofan. Setelah penyerapan dari gastrointestinal ke sirkulasi portal, hati mengubah indol menjadi indoksil melalui hidroksilasi yang dimediasi oleh enzim di hati. Percobaan in vitro dengan mikrosom tikus dan hati manusia menunjukkan bahwa enzim CYP450 menghidroksilasi indol menjadi indoksil. Selanjutnya, indoksil diubah menjadi indoksil sulfat oleh enzim sulfotransferase di hati. Berdasarkan percobaan in vitro dengan sulfotransferase human rekombinan, SULT1A1 merupakan enzim sulfotransferase utama yang berperan dalam konversi indoksil menjadi indoksil sulfat.(Vanholder et al., 2018),(Banoglu et al., 2001)(Zhang & Davies, 2016)

Setelah proses hidroksilasi dan sulfasi di hati, indol menjadi IS dan masuk kembali ke sirkulasi darah. Pada kondisi ginjal berfungsi normal, IS serum masuk ke sel tubulus proksimal ginjal melalui *Organic Anion Transporter (OAT) 1* dan *OAT3* yang terletak di membran basolateral, dan selanjutnya dialirkan ke dalam tubulus ginjal melalui *OAT4* yang terletak di membran apikal sel tubulus ginjal. Selanjutnya akan disekresi melalui urin. Pada kondisi PGK, terjadi penurunan *clearance* indoxyl sulfat sehingga kadarnya akan meningkat dalam serum. Pada pasien PGK, indoxyl sulfat tidak dapat dihilangkan melalui proses dialisis karena ikatannya dengan protein. Sekitar 90% IS berikatan dengan albumin.(Liu et al., 2018), (Tan et al., 2017)

Indol adalah agonis untuk *aryl hydrocarbon receptor (AHR)*, faktor transkripsi yang mengatur ekspresi interleukin (IL) 22, meningkatkan

aktivitas sel TH17, dan mempertahankan homeostasis intraepithelial. Indol mengatur ekspresi protein *tight junction* dan memodulasi ekspresi gen pro dan anti inflamasi pada sel epitel usus. Kerja AHR ini membantu memastikan bahwa bakteri komensal lebih dominan dibandingkan bakteri patogen dalam mikrobiota usus. (Zhang & Davies, 2016), (Holle et al., 2020)



Gambar 3. Metabolisme indoxyl sulfat (Zhang & Davies, 2016)

Indoxyl sulfat berperan penting tidak hanya pada progresi PGK, tetapi juga pada penyakit kardiovaskuler dan gangguan mineralisasi tulang pada PGK. Indoxyl sulfat memasuki sel tubulus ginjal melalui OAT 1 dan OAT 3 kemudian menginduksi produksi radikal bebas, menurunkan kadar nitric oxide, dan mengaktifasi AHR untuk memproduksi ROS yang menyebabkan kerusakan sel. Pada sistem kardiovaskuler, terjadi disfungsi sel endotelial dan *vascular smooth muscle cells* (VSMCs). Kadar IS serum

berhubungan dengan kadar pentosidine dan high density lipoprotein cholesterol, yang merupakan faktor risiko aterosklerosis pada pasien HD. Di VSMCs, IS meningkatkan aktivitas nicotinamide adenine dinucleotide Phosphate (NADPH) oksidase seperti NOX₄ yang menyebabkan pembentukan radikal bebas dan peningkatan protein osteoblas seperti *core binding factor 1 (CBF-1)*, alkali fosfatase, dan osteopontin. NOX₄ merupakan faktor penting dalam transformasi sel-sel otot polos aorta menjadi *osteoblast like cells*. Di samping itu, IS meningkatkan fosforilasi *epidermal growth factor receptor (EGFR)* yang akan meningkatkan sinyal dari angiotensin II. Indoxyl sulfat dan angiotensin II memiliki efek sinergis yaitu meningkatkan ekspresi EGFR di VSMCs, meningkatkan migrasi sel, aktivitas *extracellular signal regulated kinases (ERK)* dan berpotensi menyebabkan aterosklerosis arteri pada pasien PGK. Indoxyl sulfat meningkatkan efek angiotensin II dan aktivasi sistem renin-angiotensin-aldosteron serta menginduksi aktivitas methyltransferase, meningkatkan metilasi dari gen Klotho, mengurangi aktivitas Klotho di darah, dan merusak VSMCs, sel-sel endotel vaskuler, dan sel-sel otot jantung. (Tan et al., 2017) (Liu et al., 2018)

Sebuah studi memperlihatkan IS meningkatkan produksi ROS melalui aktivasi NADPH oksidase dan berhubungan dengan peningkatan marker inflamasi pada pasien PGK seperti TNF- α , IL-6 dan kerusakan vaskuler dengan menginduksi substansi vasoaktif yang berhubungan dengan aterosklerosis seperti kemokin, sitokin, dan *cell adhesion*

molecules. Tingginya kadar IS pada pasien PGK non dialisis berhubungan secara signifikan dengan kejadian penyakit kardiovaskuler dan kematian. (Borges et al., 2016)

Pada kondisi PGK, IS menghambat ekspresi OAT1, OAT3, maupun OAT4 di tubulus ginjal sehingga mengurangi sekresi IS ke dalam urin. Tingginya kadar IS di tubulus proksimal menginduksi nefrotoksisitas melalui aktivasi nuclear factor kappa B (NF- κ B) dan ekspresi plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1). Indoxyl sulfat akan menstimulasi sel tubulus ginjal untuk memproduksi TGF- β 1 dan kemokin seperti intercellular adhesion molecule 1, monosit chemoattractant protein 1 (MCP-1), osteopontin, dan endotelin 1, menginduksi produksi radikal bebas di sel tubulus ginjal dan sel mesangial, memicu stres oksidatif, meningkatkan ekspresi sitokin dan respon inflamasi, dan menyebabkan kerusakan sel. Radikal bebas meningkatkan aktivitas NF- κ β dan TIMP-1, sehingga meningkatkan kinerja plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1). TGF- β 1 merangsang produksi TIMP-1 dan kolagen. Sel tubular yang rusak berdegenerasi menjadi miofibroblas melalui *epithelial to mesenchymal transition (EMT)* yang menyebabkan fibrosis interstisial. Oleh karena itu, akumulasi IS sistemik dapat membuat sel tubulus ginjal menjadi rentan fibrosis interstisial. (Ramezani et al., 2016), (Liu et al., 2018) (Cheng et al., 2020)

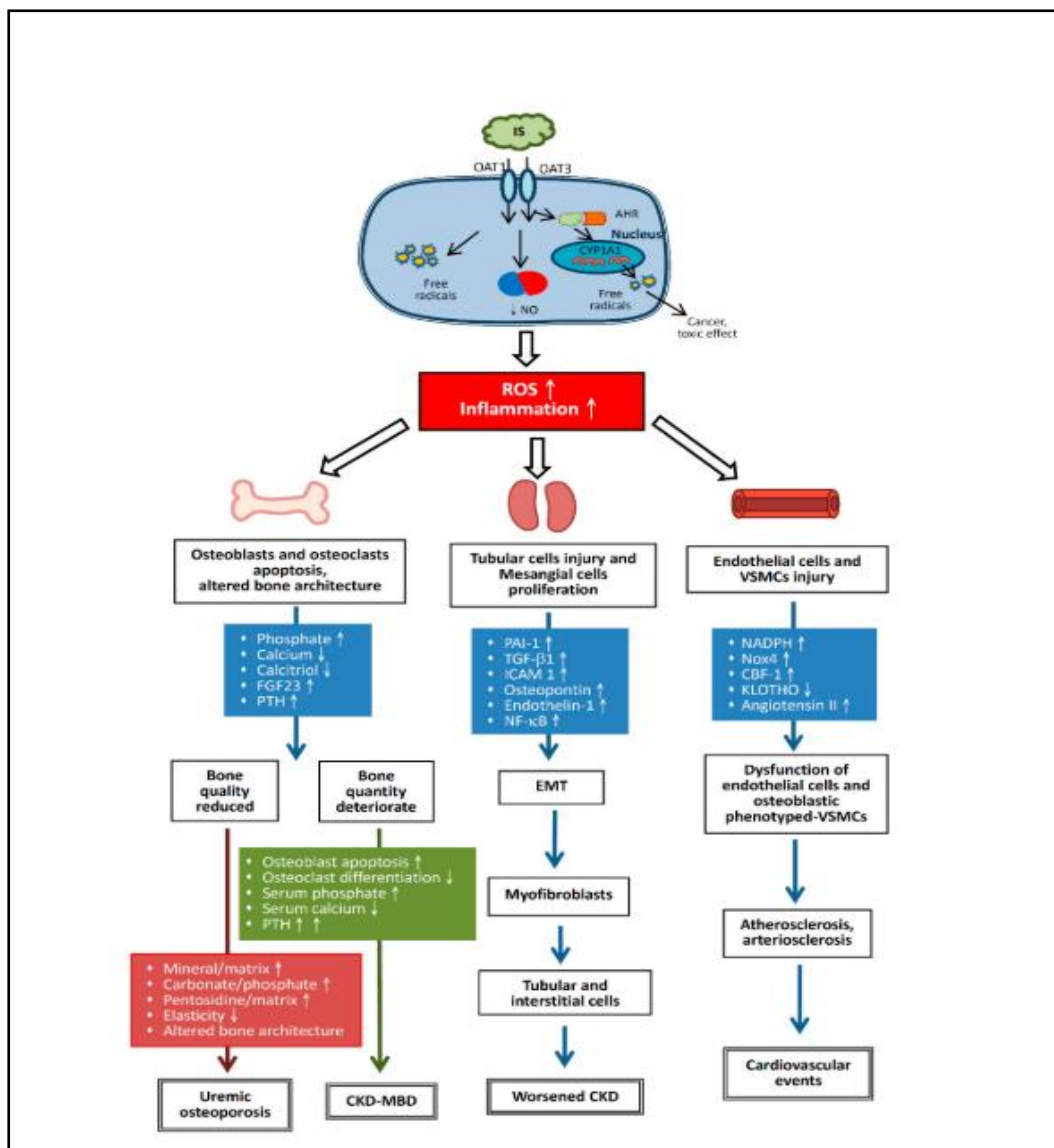
Sebuah penelitian yang melibatkan tikus uremik memperlihatkan bahwa pemberian IS menyebabkan penurunan aktivitas superoksida di ginjal dan pada akhirnya menyebabkan fibrosis interstisial ginjal dan

glomerulosklerosis sehingga menyebabkan toksin uremik lebih sulit dikeluarkan, dan mempercepat penurunan fungsi ginjal. Pada PGK, kemampuan untuk menghilangkan IS berkurang dan terjadinya inflamasi kronis menyebabkan peningkatan kadar IS dalam serum. Konsentrasi IS yang tinggi meningkatkan stres oksidatif, meningkatkan produksi radikal bebas, dan meningkatkan ekspresi dari gen inflamasi. (Ramezani et al., 2016), (Liu et al., 2018) Indoxyl Sulfat dikaitkan dengan progresivitas sklerosis glomerulus, peningkatan disfungsi endotel, peningkatan adhesi monosit ke endotel vaskuler, dan peningkatan stres oksidatif. (Holle et al., 2020)

Didapatkan bahwa indoxyl sulfat memiliki efek pada massa tulang pasien PGK. IS menurunkan aktivitas osteoblas dan osteoklas dengan meningkatkan apoptosis osteoblas dan menghambat diferensiasi dan maturasi osteoklas. Efek lain IS yaitu menurunkan ekspresi reseptor hormon paratiroid di tulang dan menghambat produksi cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) oleh osteoblas yang dirangsang hormon paratiroid sehingga menurunkan *turnover rate* tulang pada stadium awal PGK. Pada pasien PGK tahap lanjut terjadi peningkatan kadar fosfor, berkurangnya kadar calcium serum, dan berkurangnya kadar vitamin D menginduksi hiperparatiroidisme, meningkatkan inflamasi, dan peningkatan aktivitas osteoklas sehingga proses resorpsi melebihi proses pembentukan tulang. Sebagai konsekuensinya, sejumlah besar kalsium dan fosfor akan dilepaskan dan menyebabkan turnover rate tulang meningkat dan densitas

tulang akan menurun menyebabkan osteoporosis. (Liu et al., 2018)

Kekuatan tulang tidak hanya berdasarkan massa tulang, tetapi juga oleh kualitas tulang. Semakin menurunnya fungsi ginjal menyebabkan kemampuan dan fungsi osteoblas dan osteoklas menurun dan hormon paratiroid disekresikan menyebabkan berkurangnya kuantitas tulang sehingga terjadi osteodistrofi ginjal. (Leong & Sirich, 2016)



Gambar 4. Mekanisme kerja Indoxyl Sulfat (Liu et al., 2018)

G. Tinjauan Umum tentang Madu terhadap Mikrobiota Usus

Madu adalah larutan kental yang mengandung berbagai molekul, termasuk fruktosa dan glukosa (80 - 85%), air (15-17%), abu (0,2%), protein dan asam amino (0,1 - 0,4%) dan sejumlah kecil enzim, vitamin dan zat lain, seperti senyawa fenolik. Namun, komposisi madu bervariasi tergantung pada jenis tanaman tempat lebah mengkonsumsi nektar. Meski demikian, hampir semua madu di seluruh dunia mengandung jenis asam fenolik yang serupa, termasuk asam caffeic, ellagic, ferulic dan p-coumaric; flavonoid, seperti apigenin, chrysin, galangin, hesperetin, kaempferol, pinocembrin, quercetin, dan anti oksidan, seperti tokoferol, asam askorbat, superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT), dan glutathione tereduksi (GSH). (Ismail, 2017) (Miguel et al., 2017)

Madu trigona adalah madu yang diproduksi oleh lebah tanpa sengat yaitu *Trigona Sp.* dan memiliki karakteristik yang unik baik dari warna, rasa, viskositas, komposisi air, gula, kalsium, protein, lemak dan karbohidrat. Madu ini memiliki aroma dan rasa yang berbeda, teksturnya lebih cair, warna lebih gelap, rasa yang lebih tajam, dan lambat dalam proses mengkristal. (Ismail, 2017) Madu berperan terhadap mikrobiota usus melalui beberapa mekanisme, di antaranya madu sebagai prebiotik dan probiotik. Beberapa tahun terakhir, polifenol juga berperan sebagai prebiotik karena proses metabolismenya di usus. (Plata et al., 2019).

Tabel 5. Komposisi madu trigona

Parameter	Madu Trigona
Vitamin C	0.15%
Protein	1.32%
Lemak	0.23%
Karbohidrat	64.12%
Flavonoid	159.62 ppm
Beta karoten	10.61 ppm
Polifenol	133.52 ppm
Calcium	273.23 ppm
Magnesium	338.94 ppm
Zinc	12.49 ppm
pH	5.75

Sumber : (Syamsul et al., 2021)

1. Madu sebagai prebiotik

Prebiotik merupakan bahan pangan atau senyawa yang terkandung dalam makanan, tidak dapat dicerna oleh tubuh tepatnya oleh enzim amilase pankreas ataupun oleh enzim *brush borders* seperti dextrinase dan glukamilase. (Mohan et al., 2017). Kategori prebiotik mencakup fruktan rantai pendek dan panjang (Frukto-oligosakarida (FOS) dan inulin), Galakto-oligosakarida (GOS), dan laktulosa. Senyawa ini, jika dimasukkan ke dalam makanan dalam jumlah kecil (5-20 g / hari), merangsang pertumbuhan *Bifidobacteria* dan *Lactobacilli*. (Guarino et al., 2020)

Dalam beberapa dekade terakhir, penelitian pada madu telah memperlihatkan manfaat prebiotik bagi kesehatan, termasuk efek pada traktus gastrointestinal yaitu pencegahan kerusakan akibat bakteri patogen atau modulasi sistem imun, peningkatan fungsi barrier

usus, mengurangi populasi bakteri patogen, dan produksi asam lemak rantai pendek. Mengenai efek potensial pada saluran pencernaan, prebiotik, dapat memodulasi komposisi dan aktivitas mikrobiota usus. Umumnya di usus, enzim yang menghidrolisis ikatan polimer prebiotik kurang, sehingga dapat tahan pada pencernaan usus kecil dan mencapai usus besar secara utuh, dimana prebiotik mengalami proses fermentasi oleh bakteri menguntungkan, seperti *Lactobacilli* dan *Bifidobacteria*.(Guarino et al., 2020)

Sekitar 10% komposisi madu terdiri atas gula kompleks disakarida sampai oligosakarida. Kelompok oligosakarida ini tidak dihidrolisis dan tidak diabsorpsi di saluran cerna bagian atas dan bermanfaat terhadap pertumbuhan dan aktivitas bakteri baik di usus. Oligosakarida utama dalam madu Apis adalah sukrosa, maltosa, trehalosa dan turanosa, serta beberapa nutrisi seperti panose, 1-kestosa, 6-kestosa dan palatinosa. Dibandingkan dengan madu Apis, madu Honeydew mengandung oligosakarida melezitose dan raffinose dalam jumlah yang lebih tinggi (Tabel 6).(Mohan et al., 2017)

Tabel 6. Komposisi karbohidrat dalam madu (%)

	Madu Nektar	Madu Honeydew
Monosakarida		
Fruktosa	38.2	31.8
Glukosa	31.3	26.1
Disakarida		
Sukrosa	0.7 – 1.31	0.5 – 0.8
Maltosa dan lainnya	5 – 7.31	4 – 8.8
Trisakarida		
Melezitosa	< 0.1	4.0
Erlosa dan lainnya	1 – 1.5	4 – 4.7
Oligosakarisa	3.1	10.1
Total karbohidrat	79.7	80.5

Sumber : (Mohan et al., 2017a)

Telah dilaporkan bahwa madu memiliki kemampuan untuk meningkatkan pertumbuhan dan aktivitas bakteri *Bifidobacteriae* pada intestinal secara in vitro. (Jan Mei et al., 2010) Penelitian lain menunjukkan bahwa madu mendukung pertumbuhan *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrukei subsp bulgaricus*, atau *Bifidobacterium bifidum*. (Ismail, 2017) Efek yang menguntungkan dari madu Manuka dalam meningkatkan pertumbuhan probiotik (*Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, dan *Bifidobacterium lactis*) dan menghambat bakteri patogen (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, dan *Staphylococcus aureus*). (Mohan et al., 2017b)

Fermentasi FOS oleh *Bifidobacteria* akan menghasilkan SCFA, menurunkan pH intestinal, menarik air ke dalam lumen usus sehingga

bersifat laksatif melalui mekanisme tekanan osmotik sehingga mencegah akumulasi ammonia dan nitrogen. (Venereol et al., 2012)

2. Madu sebagai probiotik

Probiotik adalah mikroorganisme yang berperan terhadap kesehatan pada konsentrasi tertentu. Sebagian besar probiotik adalah strain bakteri asam laktat yaitu *Lactobacillus* atau *Bifidobacterium*. (Mohan et al., 2017b) Berbagai studi pada manusia menunjukkan manfaat bakteri di traktus gastrointestinal. Probiotik menghasilkan bakteriosin yang menghambat perkembangbiakan bakteri patogen, meningkatkan degradasi *waste products*, menurunkan respons inflamasi dengan memblokir reseptor, dan berperan pada respon imun sehingga memperbaiki permeabilitas mukosa usus. Produksi asam organik oleh bakteri asam laktat juga menurunkan pH intestinal sehingga dapat menghambat bakteri patogen. (Mafrá et al., 2019), (Aina et al., 2020)

Bifidobacteria efektif memperbaiki kerusakan epitel, mengembalikan fungsi epitel, dan menghasilkan asam lemak rantai pendek, khususnya butirat, yang berperan sebagai sumber nutrisi spesies bakteri lain seperti *Lactobacillus*. *Lactobacillus acidophilus* dan *Bifidobacterium bifidum* meningkatkan kekebalan dan memiliki efek stabilisasi pada barrier mukosa usus. *Enterococcus faecalis* dapat menghasilkan bakteriosin (peptida antimikroba), yang dapat menghambat pertumbuhan berlebih dari patogen di usus besar pasien PGK. (Tian et al., 2022)

Probiotik terdiri dari bakteri hidup, seperti spesies *Bifidobacteria*, *Lactobacilli*, dan *Streptococci*, yang dapat mengubah mikrobiota usus dan mempengaruhi inflamasi. Penelitian oleh Aina dkk menunjukkan hasil bahwa madu heterotrigona itama mengandung *B. amyloliquefaciens* HTI-19 dan *B. subtilis* HTI-23 diisolasi dari madu lebah tanpa sengat dan memiliki sifat probiotik.(Aina et al., 2020)

3. Madu trigona dan polifenol

Polifenol merupakan fitokemikal yang berasal dari tanaman. Dibagi menjadi flavonoid dan non flavonoid serta terdapat dua bentuk struktur utama yaitu yang terikat dengan gula membentuk glikosida, sedangkan yang bebas membentuk aglikons. Polifenol aglikon terbagi atas : flavonoid (flavonol, flavonone, antosianidin, chalcone, dihydroflavonol dan isoflavone), lignan, stilbenes, dan tannins (*phenolic acid*). (Bogdanov et al., 2008)

Tabel 7. Kandungan polifenol pada madu

Golongan	Kandungan
Flavonoid	
Flavonol	Quercetin, kaempferol, galangin, fisetin
Flavanone	Pinocembrin, naringin, hesperidin
Flavone	Apigenin, acacetin, chrysin, luteolin
Asam fenolik	Asam kafeic, asam cinnamic, asam ellagic, asam protocatechuic, asam syringic, asam p-hydroxybenzoic, asam vanillic, asam p-coumaric, asam sinapic, asam p-methoxybenzoic, asam p-methoxycinnamic

Sumber : (Vit, Pedro, 2012)

Kadar flavonoid bervariasi antara 60 – 460 µg/100 gr madu. Sebagian besar polifenol pada madu adalah flavonoid (*quercetin, luteolin, kaempferol, apigenin, chrysin, galangin*), asam fenolik, dan derivat asam fenolik. (Bogdanov et al., 2008)

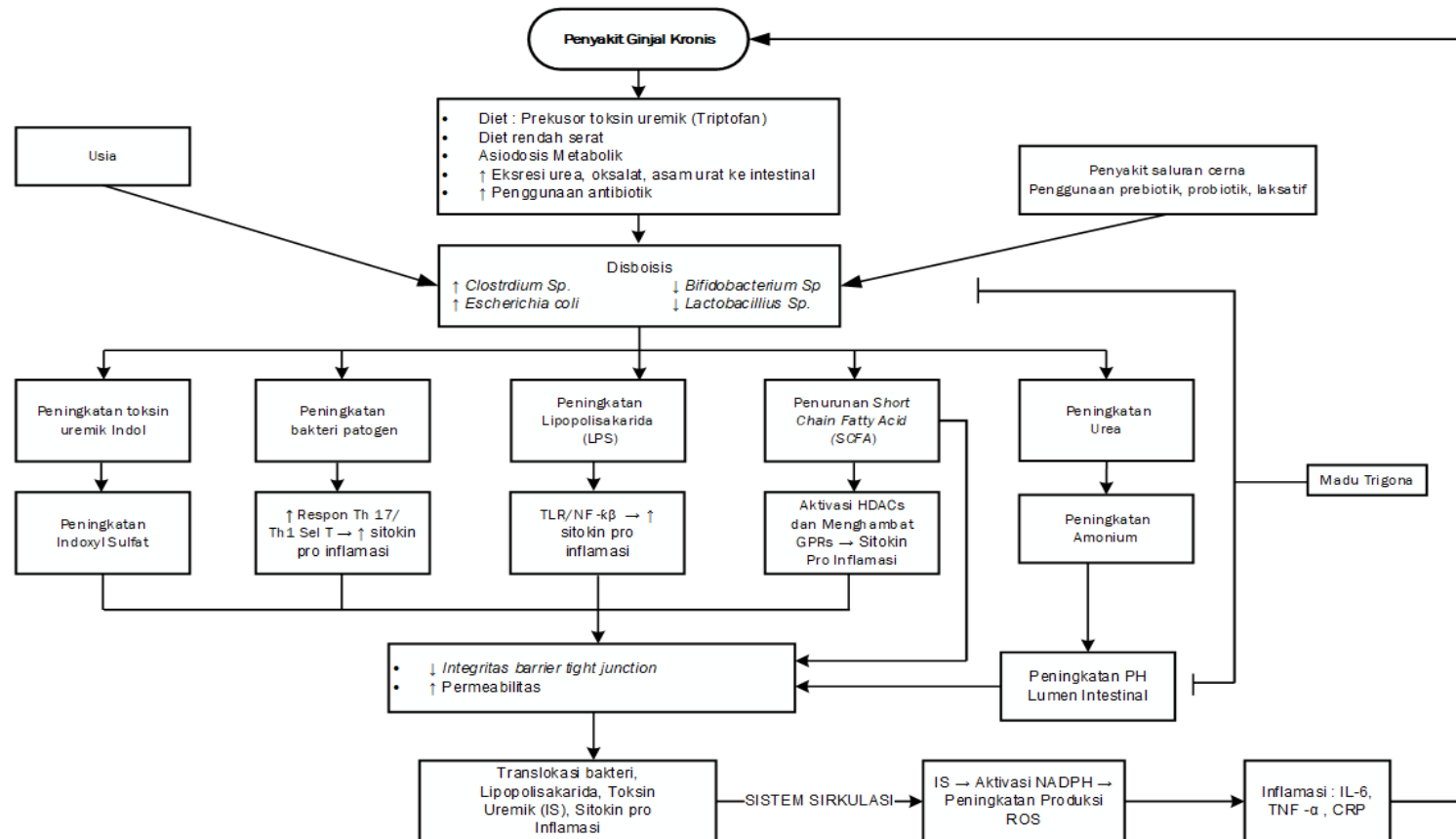
Beberapa tahun terakhir, polifenol juga berperan dalam modulasi mikrobiota usus sehingga berperan sebagai anti oksidan dan anti inflamasi. (Plata et al., 2019) Selain mengubah komposisi mikrobiota, polifenol juga meningkatkan diversitas mikrobiota usus dengan cara meningkatkan sekresi mukus dan kadar oksigen dalam lumen. Mukus merupakan barier pertama dalam melawan bakteri patogen di traktus intestinal. Polifenol menjaga integritas mukus dengan cara meningkatkan sekresi musin, menghambat pertumbuhan bakteri yang mendegradasi mukus, meningkatkan komposisi mikroba sehingga kehilangan mukus lebih sedikit. Polifenol mempengaruhi kadar oksigen dalam lumen dengan cara mengikat reactive oxygen species (ROS) sehingga menjaga homeostasis redoks sistemik dan akhirnya meningkatkan keseimbangan mikrobiota usus. (Catalkaya et al., 2020)

Penelitian telah menunjukkan bahwa polifenol dapat membantu menjaga kesehatan usus dengan mempromosikan perkembangan bakteri menguntungkan (*Lactobacilli* dan *Bifidobacteria*) sehingga menjaga keseimbangan mikrobiota usus dan menghambat bakteri patogen sehingga menunjukkan efek prebiotik. (Buketov & Krasnen'Kyi, 2013) Sebuah penelitian menunjukkan peningkatan yang signifikan pada jumlah

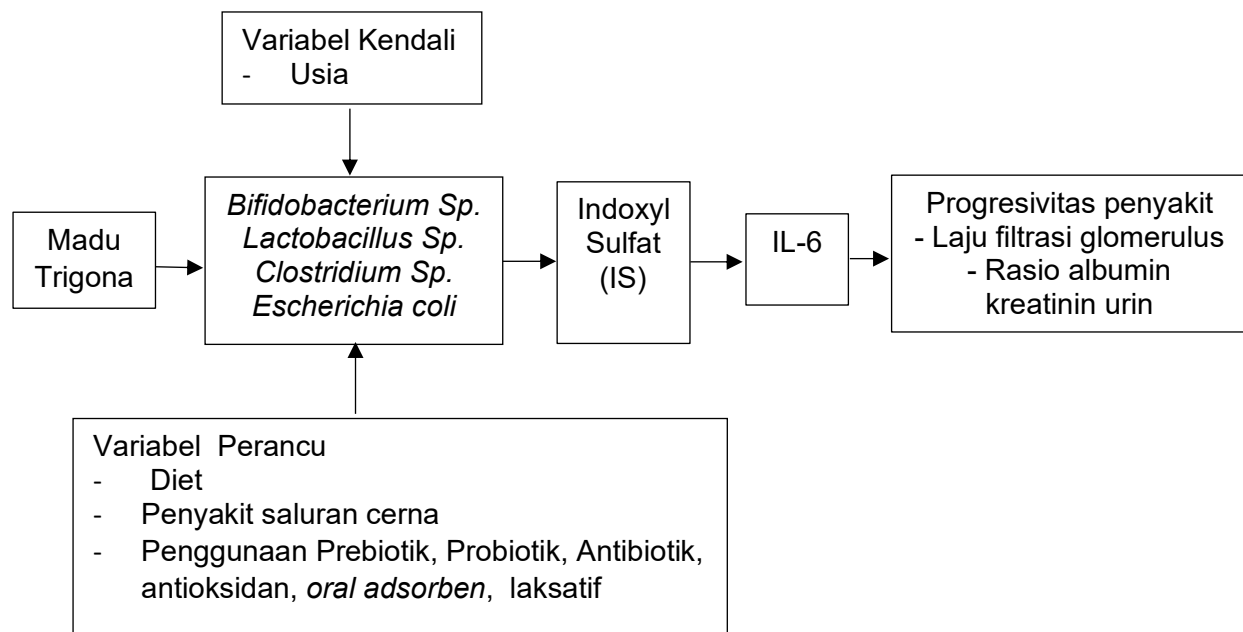
Bifidobacterium setelah konsumsi minuman yang mengandung blueberry menunjukkan bahwa polifenol pada blueberry berperan dalam regulasi komposisi mikrobiota usus. (Buketov & Krasnen'Kyi, 2013) Asam klorogenik yang merupakan turunan dari asam kafeic menghambat pertumbuhan *Desulfovibrionaceae*, *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Erysipelotrichaceae*, dan meningkatkan pertumbuhan *Bacteroidaceae* dan *Lactobacillaceae*.(Bao et al., 2020)

Komponen bioaktif polifenol dapat memodulasi mikrobiota usus seperti cathechin yang dapat menghambat upregulasi TLR4, aktivasi NF- κ B dan aktivasi NOX₄ sehingga menurunkan respon inflamasi pada ginjal. Komponen bioaktif lain yaitu asam klorogenik meregulasi disbiosis mikrobiota usus pada PGK.(Bao et al., 2020)

H. Kerangka Teori



I. Kerangka Konsep



Variabel Penelitian

1. Variabel independent : Madu Trigona
2. Variabel dependent : Progresivitas penyakit (laju filtrasi glomerulus, rasio albumin kreatinin urin)
3. Variabel antara : *Bifidobacterium Sp.*, *Lactobacillus Sp.*, *Clostridium Sp.*, *Escherichia coli*, kadar indoxyl Sulfat, Interleukin-6 (IL-6)
4. Variabel kendali : Usia
5. Variabel perancu : Diet, penyakit saluran cerna, penggunaan Prebiotik, Probiotik, Antibiotik, antioksidan, *oral adsorben* dan laksatif.

J. Hipotesis Penelitian

1. Madu Trigona meningkatkan jumlah *Bifidobacterium Sp.* pada pasien penyakit ginjal kronis lebih besar dibandingkan kontrol.
2. Madu Trigona meningkatkan jumlah *Lactobacillus Sp.* pada pasien penyakit ginjal kronis lebih besar dibandingkan kontrol.
3. Madu Trigona menurunkan jumlah *Clostridium Sp.* pada pasien penyakit ginjal kronis lebih besar dibandingkan kontrol.
4. Madu Trigona menurunkan jumlah *Escherichia coli* pada pasien penyakit ginjal kronis lebih besar dibandingkan kontrol.
5. Madu Trigona menurunkan kadar Indoxyl Sulfat pada pasien penyakit ginjal kronis lebih besar dibandingkan kontrol.
6. Madu Trigona menurunkan kadar IL-6 pada pasien penyakit ginjal kronis lebih besar dibandingkan kontrol.
7. Madu Trigona memperlambat penurunan LFG pada pasien penyakit ginjal kronis lebih besar dibandingkan kontrol.
8. Madu Trigona menurunkan rasio albumin kreatinin urin pada pasien penyakit ginjal kronis lebih besar dibandingkan kontrol.

K. Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Kriteria Objektif	Satuan	Skala Ukur
Madu	Madu yang diberikan adalah madu trigona	Dosis Madu trigona yang diberikan 2x35 gram selama 8 minggu	gram	Numerik
Jumlah bakteri	Jumlah bakteri (<i>Lactobacillus Sp.</i> , <i>Bifidobacterium Sp.</i> , <i>Clostridium Sp.</i> , <i>E.Coli</i>) dalam 1 ml feces ditentukan dengan pemeriksaan RT- PCR.	Jumlah bakteri (<i>Lactobacillus Sp.</i> , <i>Bifidobacterium Sp.</i> , <i>Clostridium Sp.</i> , <i>E.Coli</i>)	(Log copies DNA/ml)	Numerik
Kadar Indoxyl Sulfat	Kadar toksin uremik yang terikat protein dan berasal dari metabolisme mikrobiota usus, ditentukan dengan pemeriksaan ELISA.	Nilai kadar indoxyl Sulfat	ng/dL	Numerik
Kadar interleukin-6	Kadar protein respon imun sebagai mediator pro inflamasi ditentukan dengan pemeriksaan ELISA.	Nilai kadar IL-6	pg/dL	Numerik
Rekam makan 24 jam	Jumlah dan jenis makanan yang	Rata-rata konsumsi makanan dalam	Energi (kalori/hari), karbohidrat	Numerik

	dikonsumsi, diukur dengan menggunakan <i>food record</i> .	24 jam terakhir, yang diambil sebanyak 2 kali (sebelum dan setelah intervensi)	(gram/hari), protein (gram/hari), serat (gram/hari)	
Perubahan laju filtrasi glomerulus	Perubahan volume plasma yang disaring oleh glomerulus per satuan waktu, merupakan marker fungsi ginjal untuk mendiagnosis, menentukan stadium, dan mengelola PGK serta gangguan ginjal akut	Perubahan rata-rata LFG sebelum dan setelah intervensi. Kadar kreatinin serum diperiksa menggunakan metode <i>enzymatic</i> , dimasukkan dalam Formula <i>Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration</i> (CKD-EPI)	ml/mnt/1,73m ²	Numerik
Laju ekskresi albumin urin	Laju ekskresi albumin urin adalah Jumlah albumin yang dikeluarkan melalui urin persatuan waktu,	Perubahan rata-rata laju ekskresi albumin urin sebelum dan setelah intervensi	mg/g kreatinin	Numerik