



Uji Efek Protektif Kombinasi Minyak Jintan Hitam (*Nigella sativa*) Komersial dan Madu pada Sel Leydig Tikus Jantan Galur Wistar yang Diberi Pajanan Cisplatin

¹Muhammad Afia Akbar Putranda, ²Muhammad In'am Ilmiawan, ³Mitra Handini

¹Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura

²Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura

³Departemen Fisiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura

Jalan Prof. Hadari Nawawi, Pontianak, Kalimantan Barat 78115

Email: muhammadafiaakbar@gmail.com, inam@medical.untan.ac.id, handinim@medical.untan.ac.id

ABSTRAK

Cisplatin merupakan obat antikanker yang memiliki sifat toksik bagi sel normal seperti sel Leydig. Kombinasi minyak jintan hitam dan madu sebagai antioksidan diketahui memberikan efek protektif pada sel akibat paparan cisplatin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek protektif kombinasi minyak jintan dan madu pada gambaran histologi sel Leydig yang diberi pajanan cisplatin. Desain penelitian ini adalah *randomized post-test only control group* menggunakan 30 ekor tikus yang dibagi dalam 10 kelompok: kontrol (K), MJH I 1 ml/kgBB (P1), MJH II 2 ml/kgBB(P2), M I 3,7 ml/kgBB(P3), M II 7,4 ml/kgBB(P4), kelompok kombinasi MJH I dan M I (P5), MJH I dan M II (P6), MJH II dan M I (P7), MJH II dan M II (P8), dan kelompok cisplatin (C). Minyak jintan hitam dan madu diberikan secara oral selama 21 hari. Cisplatin 8 mg/kgBB diberikan secara intraperitoneal di hari ke-18 pada semua kelompok kecuali kontrol. Sel Leydig diamati menggunakan mikroskop cahaya pada 10 lapang pandang besar/kecil kemudian dihitung persentase kerusakannya. Hasilnya menunjukkan minyak jintan hitam dan madu dalam bentuk tunggal dan kombinasi mengurangi kerusakan sel Leydig. Kelompok kombinasi minyak jintan hitam dan madu memberikan efek protektif yang sinergis terhadap sel Leydig tikus yang diberi pajanan cisplatin.

Kata kunci: *cisplatin, minyak jintan hitam, madu, sel leydig, efek sinergis*

ABSTRACT

Cisplatin is an anticancer drug having toxic effect on normal cells including Leydig cells. Combination of black seed oil and honey as antioxidants is known to provide a protective effect on cells exposed to cisplatin. This research aimed at determining the protective effects of black seed oil and honey combination on histological appearance/damage of cisplatin-induced Leydig cells. This study was a randomized post test only control group study. Thirty rats were divided into 10 groups: control (K), MJH I 1 ml/kgBW(P1), MJH II 2 ml/kgBW(P2), M I 3.7 ml/kgBW(P3), M II 7.4 ml/kgBW(P4), combination of MJH I and M I (P5), MJH I and M II (P6), MJH II and M I (P7), MJH II and M II (P8), and cisplatin (C). Black seed oil and honey were given orally for 21 days. Cisplatin 8 mg/kgBW was given intraperitoneally on the 18th day to all groups except control group. Damage of Leydig cells was evaluated using light microscope in 10 small/large visual fields. Administration of black seed oil and honey in single and combination form reduced the percentage of Leydig cell damage. The combination of black seed oil and honey showed synergistic protective effects against cisplatin-induced damage in Leydig cells.

Keywords: *cisplatin, black seed oil, honey, leydig cells, synergistic effects*

Pendahuluan

Cisplatin secara luas digunakan dalam terapi keganasan hematologi dan tumor solid¹. Meskipun digunakan sebagai obat antikanker, *cisplatin* juga memiliki efek samping berupa sifat toksik yang tinggi jika dikonsumsi². Testis merupakan organ reproduksi pria yang berfungsi dalam proses spermatogenesis. Di dalam testis terdapat banyak tubulus seminiferous, yang terdiri dari sel-sel spermatogenik dan sel-sel substentakular atau sel Sertoli, serta sel Leydig yang berada diantara tubulus seminiferous³.

Cisplatin mengakibatkan rusaknya fungsi testis serta menurunnya spermatogenesis melalui apoptosis sel gamet dan penurunan jumlah sel Leydig⁴. Rusaknya sel Leydig dapat mengurangi produksi testosteron yang berdampak pada spermatogenesis dan perkembangan karakter seks sekunder³.

Saat ini, terdapat ketertarikan terhadap penggunaan obat herbal untuk mengobati berbagai macam penyakit. Hal ini didukung oleh kesadaran pasien bahwa obat herbal juga dapat memberikan dampak positif dalam mengatasi perkembangan penyakit dengan berbagai keuntungan seperti tingkat keamanan yang relatif tinggi, sedikitnya efek samping, dan pada umumnya bisa dibeli dengan harga yang lebih murah. Obat herbal juga berperan sebagai terapi tambahan dari terapi obat sintetis⁵.

Jintan hitam merupakan satu dari berbagai macam obat herbal yang dimanfaatkan di dunia, khususnya di Indonesia. Jintan hitam mengandung banyak senyawa kimia yang bermanfaat bagi tubuh seperti antioksidan. Selain itu, obat herbal ini juga mengandung

nigellon dan *glutathion* yang berfungsi melindungi tubuh dari berbagai zat xenobiotik⁶.

Madu juga merupakan obat alamiah yang cukup sering digunakan oleh masyarakat Indonesia⁷. Madu juga memiliki efek antioksidan dan memberikan efek protektif terhadap radikal bebas pada berbagai organ dalam tubuh^{8,9}.

Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk menguji efek protektif dari minyak jintan hitam dan madu khususnya dalam bentuk kombinasi keduanya pada sel Leydig tikus wistar yang diberi pajanan cisplatin.

Metode

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental lanjutan dari penelitian sebelumnya menggunakan bahan biologis tersimpan. Penelitian dilakukan pada Bulan Juli 2019 hingga Bulan September 2019. Desain penelitian yang digunakan adalah *randomized post-test-only control group*. Sampel terdiri dari 30 tikus jantan galur wistar berumur 2 hingga 3 bulan dengan berat 180-220 gram yang diaklimatisasi selama 1 minggu dan dikelompokkan secara acak sebanyak 3 ekor tikus per kelompoknya. Kelompok perlakuan terdiri dari¹⁰:

1. Kelompok Kontrol (K) diberi NaCl 0,9% dosis 1 ml/kgBB secara intraperitoneal pada hari ke-18.
2. Kelompok Perlakuan 1 (P1) diberi minyak jintan hitam dengan dosis 1 ml/kgBB 1 kali sehari selama 21 hari.
3. Kelompok Perlakuan 2 (P2) diberi minyak jintan hitam dengan dosis 2 ml/kgBB 1 kali sehari selama 21 hari.

4. Kelompok Perlakuan 3 (P3) diberi madu dengan dosis 3,7 ml/kg 1 kali sehari selama 21 hari.
5. Kelompok Perlakuan 4 (P4) diberi madu dengan dosis 7,4 ml/kgBB 1 kali sehari selama 21 hari.
6. Kelompok Perlakuan 5 (P5) diberi dosis kombinasi minyak jintan hitam dan madu masing-masing 1 ml/kgBB dan 3,7 ml/kgBB 1 kali sehari selama 21 hari.
7. Kelompok Perlakuan 6 (P6) diberi dosis kombinasi minyak jintan hitam dan madu masing-masing 1 ml/kgBB dan 7,4 ml/kgBB 1 kali sehari selama 21 hari.
8. Kelompok Perlakuan 7 (P7) diberi dosis kombinasi minyak jintan hitam dan madu masing-masing 2 ml/kgBB dan 3,7 ml/kgBB 1 kali sehari selama 21 hari.
9. Kelompok Perlakuan 8 (P8) diberi dosis kombinasi minyak jintan hitam dan madu masing-masing 2 ml/kgBB dan 7,4 ml/kgBB 1 kali sehari selama 21 hari.
10. Kelompok *Cisplatin* (CP) diberi *cisplatin* pada hari ke-18 dan tetap diberi pakan *ad libitum*.

Cisplatin diberikan secara intraperitoneal pada semua kelompok kecuali kelompok kontrol pada hari ke-18. Dosis *cisplatin* yang diberikan yaitu 8 mg/kgBB 1 jam setelah pemberian minyak jintan hitam dan madu. Minyak jintan hitam dan madu diberikan terpisah secara oral.

Tikus dimatikan pada hari ke-22 dengan anestesi menggunakan kloroform terlebih dahulu. Organ testis yang diambil dimasukkan ke dalam larutan NaCl 0,9% 100 mL untuk menghilangkan darah yang menempel pada

organ. Kemudian, testis dikeringkan dengan menggunakan kertas saring dan disimpan dalam wadah yang berisi formalin. Pembuatan preparat histopatologi dengan pewarnaan haematoxylin-eosin dilakukan di Instalasi Patologi Anatomi RSUD dr. Soedarso Pontianak.

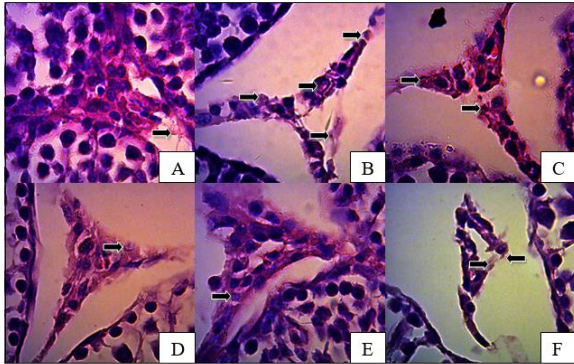
Perubahan struktur sel Leydig diamati secara mikroskopik dengan perbesaran sebesar 1000x menggunakan mikroskop cahaya. Pengamatan dilakukan pada 10 lapang pandang pada setiap preparat. Dihitung jumlah sel Leydig yang ditemukan. Kerusakan sel Leydig yang dimaksud berupa sel Leydig dengan tanda-tanda kematian sel seperti kariolisis, piknosis, maupun karioreksis.

Data dianalisis menggunakan *SPSS 20 for Windows*. Uji statistik yang menggunakan *One-way Anova* dilanjutkan dengan *Post Hoc LSD*. Indeks kombinasi dihitung menggunakan *Compusyn 2005 for Windows*. Penelitian dilakukan setelah disetujui oleh Divisi Kaji Etik Fakultas Kedokteran Universitas Tanjungpura. Nomor surat keterangan lolos kaji etik yang digunakan yaitu 4700/UN22.9/DL/2019.

Hasil

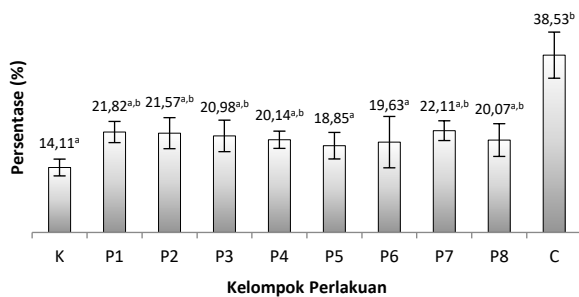
Sel Leydig diamati pada 10 lapang pandang pada setiap preparatnya. Pada setiap lapang pandang dihitung jumlah sel Leydig normal dan sel Leydig yang mengalami nekrosis. Berdasarkan gambar 1 ditemukan kematian sel Leydig pada setiap kelompok perlakuan. Namun terdapat perbedaan jumlah sel Leydig yang mengalami kematian antara kelompok kontrol (gambar 1A) dan kelompok *cisplatin* (gambar 1B) dimana sel Leydig pada

kelompok *cisplatin* mengalami lebih banyak kematian sel. Kelompok perlakuan (gambar 1C, 1D, 1E, 1F) juga menunjukkan kematian sel yang lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok *cisplatin*.



Gambar 1. Gambaran sel Leydig perbesaran 1000x. (A) kelompok K, (B) kelompok *cisplatin*, (C) kelompok MJH tunggal, (D) kelompok M tunggal, (E) kelompok kombinasi P5, dan (F) kelompok kombinasi P7. Panah hitam menunjukkan nekrosis sel Leydig.

Untuk menghitung tingkat kerusakan, dihitunglah persentase sel mati dari total sel Leydig yang ditemukan. Data kerusakan sel Leydig dapat dilihat dari grafik 1.



Gambar 2. Persentase Kematian sel Leydig. a= berbeda secara signifikan dengan kelompok C ($p<0,05$), b= berbeda secara signifikan dengan kelompok K ($p<0,05$).

Berdasarkan uji One-way Anova, didapatkan perbedaan yang signifikan ($p<0,05$). Dari hasil uji *Post Hoc* LSD, kelompok *cisplatin* (C) menunjukkan perbedaan yang signifikan dibandingkan dengan kelompok lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian

cisplatin merusak sel Leydig normal dan pemberian madu dan atau jintan hitam dapat melindungi sel Leydig dari kerusakan akibat paparan *cisplatin*. Di samping itu, terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol (K) dan kelompok lainnya, kecuali dengan kelompok P5 dan P6. Dari hasil tersebut, dapat dinyatakan bahwa kelompok perlakuan P5 dan P6 menunjukkan perlindungan sel Leydig yang terbaik dimana tingkat kerusakannya sama seperti sel Leydig kelompok normal.

Tabel 1. Indeks Kombinasi

Kelompok Kombinasi	Dosis (ml/kgBB)		Indeks Kombinasi	Interpretasi
	MJH	M		
P5	1	3,7	0,148	Sinergis Kuat
P6	1	7,4	0,630	Sinergis
P7	2	3,7	6,824	Antagonis Kuat
P8	2	7,4	0,949	Mendekati Aditif

*MJH = minyak jintan hitam; M = madu

Berdasarkan analisis indeks kombinasi menggunakan Compusyn didapatkan sesuai pada Tabel 1. Dari hasil perhitungan tersebut dapat dinyatakan bahwa terdapat efek sinergis pada P5, P6 dan P8 meskipun P8 mendekati efek kombinasi yang aditif. Akan tetapi, efek kombinasi jintan hitam dan madu pada P7 menunjukkan interaksi yang antagonis.

Pembahasan

Cisplatin dapat memberikan efek negatif pada tubuh meskipun cisplatin merupakan obat kemoterapi yang baik. Kerusakan testis merupakan contoh dari efek samping pada penggunaan cisplatin dimana terjadi kerusakan pada sel sperma dan sel

Leydig. Rusaknya sel Leydig akibat cisplatin akan menghalangi produksi testosteron yang akhirnya mengganggu proses spermatogenesis¹⁰.

Cisplatin akan menginduksi stres oksidatif sehingga meningkatkan ROS dalam tubuh dan menyebabkan kerusakan. Peningkatan ROS ini diiringi dengan penurunan antioksidan terutama GSH karena berikatan dengan cisplatin. Peningkatan ROS juga menyebabkan disfungsi mitokondria sehingga terjadi kematian sel. Pembentukan lipid peroksida juga terjadi pada pemberian cisplatin. Selain itu, Cisplatin juga dapat menginduksi terjadinya apoptosis sel dengan cara berikatan dengan DNA^{11,12}.

Pada penelitian ini, terjadi lebih banyak kerusakan pada Kelompok Cisplatin dibandingkan kelompok normal. Keadaan ini sesuai dengan penelitian oleh Soni et al dimana cisplatin menyebabkan disfungsi sel Leydig dan perubahan histologi pada sel tersebut¹². Peningkatan persentase kematian sel Leydig menjadi tanda kerusakan sel Leydig¹³. Stres oksidatif akibat cisplatin juga menyebabkan penurunan jumlah sel Leydig yang signifikan dimana Fragmentasi sel Leydig juga ditemukan^{14,15}.

Pemberian minyak jintan hitam memberikan efek protektif pada sel Leydig terbukti pada penelitian ini. Terdapat perbedaan kerusakan yang signifikan antara pemberian cisplatin dan minyak jintan hitam dengan pemberian cisplatin tanpa minyak jintan hitam. Ini dapat terjadi karena jintan hitam memiliki zat antioksidan yang dapat melindungi sel. Hal ini didukung oleh penelitian Hosseinian et al

yang membuktikan adanya efek protektif dari jintan hitam pada nefron tikus yang diberi cisplatin¹⁶.

Jintan hitam mengandung thymoquinone sebagai konstituen aktif yang paling banyak dan merupakan antioksidan yang dapat memberikan efek protektif pada sel tubuh^{16,17}. Hal ini juga terjadi pada penelitian Khither et al yang mencoba menggunakan teknik in vitro untuk melihat efek antioksidan thymoquinone. Khither et al menyimpulkan bahwa thymoquinone merupakan antioksidan yang poten. Thymoquinone memiliki aktivitas penangkapan radikal bebas yang baik terutama terhadap radikal hidroksil dan hidrogen peroksida, sehingga merupakan penghambat kuat peroksidasi lipid¹⁸. Selain itu, pada penelitian Bordoni et al menunjukkan bahwa minyak jintan hitam maupun thymoquinone dapat menjadi antioksidan yang baik untuk menangkal radikal bebas¹⁹.

Madu kaya akan senyawa asam fenolik dan flavonoid. Zat-zat tersebut memiliki efek biologis yang luas dan berfungsi sebagai antioksidan²⁰. Dalam penelitian ini, pemberian madu menunjukkan efek protektif pada sel Leydig dari kerusakan yang disebabkan oleh cisplatin. Madu kaya akan antioksidan sehingga dapat menangkap radikal bebas yang dibentuk oleh cisplatin. Hal ini sesuai dengan laporan Banihani yang menyatakan bahwa madu dapat mengurangi stres oksidatif pada testis sehingga madu dapat melindungi dan meningkatkan kelangsungan hidup sel Leydig²¹. Madu juga menunjukkan efek madu dalam melindungi sel, terutama sel di hati dan ginjal, dari stres oksidatif yang disebabkan oleh cisplatin²².

Kemampuan madu dalam melindungi sel dari stres oksidatif juga terbukti pada penelitian yang menggunakan asap rokok sebagai sumber ROS dan monosodium glutamat sebagai pemicu radikal bebas^{9,23}. Kemampuan madu sebagai antioksidan terjadi karena kemampuan asam fenolik pada madu dalam menetralkan ROS seperti lipid peroksida dan meningkatkan aktivitas antioksidan (SOD dan CAT). Selain itu, asam flavonoid pada madu dapat meningkatkan produksi GSH²³.

Kombinasi minyak jintan hitam dan madu pada P5 dan P6 dapat meminimalisir kerusakan sel Leydig akibat cisplatin hingga menyerupai sel Leydig normal. Hal ini dapat dilihat pada penelitian lain yang menunjukkan bahwa kombinasi antara ekstrak minyak jintan hitam dan madu memberikan efek obat yang lebih kuat dibandingkan dengan pemberian minyak jintan hitam saja. Pada penelitian sebelumnya yang, pemberian kombinasi minyak jintan hitam dan madu juga menunjukkan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan pemberian dalam bentuk tunggal pada jaringan hati akibat paparan cisplatin²⁴.

Berdasarkan perhitungan indeks kombinasi, didapatkan nilai indeks kombinasi pada kelompok P5, P6, P7, dan P8 sebagaimana pada tabel 1. Dari keempat kelompok tersebut, kelompok P5 menunjukkan efek yang paling sinergis dikarenakan memiliki indeks kombinasi terkecil. Hal ini berbeda dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa kelompok P7 memberikan efek yang paling sinergis di antara semua kelompok kombinasi²⁴.

Efek sinergis pada kombinasi obat yang mengandung antioksidan berbeda satu sama lain karena komposisi antioksidan yang berbeda²⁵. Akan tetapi, pasangan bahan aktif dengan mekanisme kerja yang independen dan mengobati penyakit yang sama cenderung menghasilkan efek kombinasi yang sinergis²⁶. Hal ini sesuai dengan penelitian ini dimana kombinasi thymoquinone pada minyak jintan hitam dengan asam fenolat dan flavonoid pada madu menunjukkan efek kombinasi yang cenderung sinergis.

Kesimpulan dan Saran

Pemberian minyak jintan hitam dan madu dalam bentuk tunggal maupun kombinasi memberikan efek protektif pada gambaran histologi sel Leydig yang diberi paparan cisplatin. Dosis kombinasi minyak jintan hitam dan madu yang paling sinergis dalam memberikan efek protektif tersebut masing-masing sebanyak 1 ml/KgBB dan 3,7 mL/KgBB.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan cara menguji perubahan fungsi sel Leydig yang dilihat dari kadar testosteron dalam darah. Selain itu, perlu dilakukan penelitian untuk menilai stres oksidatif pada testis akibat paparan *cisplatin* dan mengetahui senyawa apa yang ada dalam kedua bahan sehingga memberikan efek sinergis sebagai antioksidan. Perlu dilakukan penelitian tentang kombinasi senyawa tunggal pada minyak jintan hitam dan madu dalam memberikan efek protektif pada sel Leydig dari paparan *cisplatin*.

Daftar Pustaka

1. Tian M, Liu F, Liu H, Zhang Q, Li L, Hou X. Systems Biology in Reproductive Medicine Grape seed procyanidins extract attenuates Cisplatin-induced oxidative stress and testosterone synthase inhibition in rat testes and testosterone synthase inhibition in rat testes. *Syst Biol Reprod Med* [Internet]. 2018;64(4):246–59. Available from: <https://doi.org/10.1080/19396368.2018.1450460>
2. Whalen K, Finkel R, Panavelil TA. Lippincott illustrated review pharmacology. 6th Ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2015.
3. Tortora GJ, Derrickson B. Principles of anatomy & physiology. 15th Ed. Hoboken: John Wiley and Sons; 2017.
4. Sajjad H. Toxicity effect of cisplatin-treatment on rat testis tissue. *J Mens health*. 2011;8(3):235–235.
5. Supriyatna, Moelyono M, Iskandar Y, Febriyanti R. Prinsip obat herbal: sebuah pengantar untuk fitoterapi. Yogyakarta: Deepublish; 2014.
6. Musfiroh M, Gustari S. Pengaruh Pemberian Minyak Jintan Hitam (*Nigella sativa* L.) terhadap Peningkatan Spermatogenesis Tikus Wistar yang Terpapar Asap Rokok. *J Kedokt Hewan*. 2015;9(2):114–6.
7. Sudarmaji. Pembuatan feature audio visual: manfaat madu sebagai pengobatan herbal tradisional. *J IKON*. 2015;1(2):51–7.
8. Erejuwa OO, Sulaiman SA, Wahab MSA. Effects of Honey and Its Mechanisms of Action on the Development and Progression of Cancer. *Molecules*. 2014;19:2497–522.
9. Budiman J, Istiadi H, Amarwati S. Pengaruh Madu terhadap Gambaran Mikroskopis. *Media Med Muda*. 2015;4(4):1040–8.
10. Farooqui Z, Afsar M, Rizwan S, Ahmed A, Khan F. Oral administration of *Nigella sativa* oil ameliorates the effect of cisplatin on membrane enzymes, carbohydrate metabolism and oxidative damage in rat liver. *Toxicol Reports* [Internet]. 2016;3:328–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxrep.2016.02.004>
11. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy : molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*. 2014;364–78.
12. Kim HK, Choi BR, Karna KK, You JH, Kim CY, Park JK. Dose-dependent effects of cisplatin on the severity of testicular injury in Sprague Dawley rats : reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress. *Drug Des Devel Ther*. 2016;10:3959–68.
13. Lazuardi DYR, Rimayanti, Primarizky H, Sudjarwo SA, Utama S, Rachmawati K. The Effect of Blue Green Algae (*Spirulina platensis*) Extract in White Rat (*RattusNorvegicus*) Treated with Excessive Physical Exercise on Leydig Cell Number and Seminiferous Tubules Diameter. *KnE Life Sci*. 2017;3(6):684–93.
14. Mercantepe T, Unal D, Tmkaya L, Yazici

- ZA. Protective effects of amifostine , curcumin and caffeic acid phenethyl ester against cisplatin - induced testis tissue damage in rats. *Exp Ther Med.* 2018;15:3404–12.
15. Rahmawati I. Pengaruh nikotin terhadap jumlah sel leydig pada mencit (*Mus musculus*). *Stomatognatic.* 2013;10(2):82–5.
16. Hosseinian S, Rad AK, Hadjzadeh M-A-R, Roshan NM, Havakhah S, Shafiee S. The protective effect of *Nigella sativa* against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Avicenna J Phytomedicine.* 2016;6(1):44–54.
17. Islam MT, Guha B, Hosen S, Riaz TA, Shahadat S, Sousa L da R, et al. Nigellalogy : A review on *Nigella Sativa*. *MOJ Bioequivalence Bioavailab.* 2017;3(6):167–81.
18. Khither H, Sobhi W, Khenchouche A, Mosbah A, Benboubetra M. In-vitro Antioxidant Effect of Thymoquinone. *Annu Res Rev Biol.* 2018;25(5):1–9.
19. Bordoni L, Fedeli D, Nasuti C, Maggi F, Papa F, Wabitsch M, et al. Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of *Nigella sativa* Oil in Human Pre-Adipocytes. *Antioxidants.* 2019;8(51):1–12.
20. Missio P, Gauche C, Gonzaga LV, Costa CO, Fett R. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chem* [Internet]. 2015; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.051>
21. Banihani SA. Heliyon Mechanisms of honey on testosterone levels. *Heliyon* [Internet]. 2019;5(April):e02029. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02029>
22. Neamatallaha TA, El-Shitany NA, Abbas AT, Alie SS, Eid BG. Honey protects against cisplatin-induced hepatic and renal toxicity through inhibition of NF-kB-mediated COX-2 expression and oxidative stress dependent BAX/Bcl-2/caspase-3 apoptotic pathway. *Food Funct.* 2018;9(7):3743–54.
23. Mohamed M, Sulaiman SA, Jaafar H, Sirajudeen KNS. Antioxidant Protective Effect of Honey in Cigarette Smoke-Induced Testicular Damage in Rats. *Int J Mol Sci.* 2011;12:5508–21.
24. Alkadri SLF, Ilmiawan MI, Handini M. Efek Protektif Kombinasi Minyak Jintan Hitam dan Madu terhadap Hepatotoksisitas pada Tikus Akibat Sisplatin Protective Effect of Commercial Black Seed Oil and Honey Combination against Cisplatin-Induced Hepatototoxicity in Rat. *eJournal Kedokt Indones.* 2019;7(2):101–8.
25. Wang S, Zhu F. Dietary Antioxidant Synergy in Chemical and Biological Systems. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2015;57(11):2343–57.
26. Syahrir NHA, Afendi FM, Susetyo B. Efek Sinergis Bahan Aktif Tanaman Obat Berbasiskan Jejaring Dengan Protein Target. *J Jamu Indones.* 2016;1(1):35–46.