



# Jintan Hitam

*Pencegah  
Kerusakan Endotel  
karena Rokok*



**Meity Ardiana**

# Jintan Hitam

*Pencegah  
Kerusakan Endotel  
karena Rokok*

Pasal 113 Undang-Undang Nomor 28 Tahun 2014 tentang Hak Cipta:

- (1) Setiap Orang yang dengan tanpa hak melakukan pelanggaran hak ekonomi sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf i untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 1 (satu) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp100.000.000 (seratus juta rupiah).
- (2) Setiap Orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf c, huruf d, huruf f, dan/atau huruf h untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 3 (tiga) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah).
- (3) Setiap Orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf a, huruf b, huruf e, dan/atau huruf g untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 4 (empat) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp1.000.000.000,00 (satu miliar rupiah).
- (4) Setiap Orang yang memenuhi unsur sebagaimana dimaksud pada ayat (3) yang dilakukan dalam bentuk pembajakan, dipidana dengan pidana penjara paling lama 10 (sepuluh) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp4.000.000.000,00 (empat miliar rupiah).

# Jintan Hitam

*Pencegah  
Kerusakan Endotel  
karena Rokok*

**Meity Ardiana**



## **JINTAN HITAM PENCEGAH KERUSAKAN ENDOTEL KARENA ROKOK**

Meity Ardiana

ISBN: 978-602-473-908-9 (PDF)

© 2022 Penerbit **Airlangga University Press**

Anggota IKAPI dan APPTI Jawa Timur

Kampus C Unair, Mulyorejo Surabaya 60115

Telp. (031) 5992246, 5992247 Fax. (031) 5992248

E-mail: adm@aup.unair.ac.id

Redaktur (Sarah Khairunnisa)

Layout (Djaiful Eko Suharto)

Cover (Erie Febrianto)

AUP (1265/01.23)

Hak Cipta dilindungi oleh undang-undang.

Dilarang mengutip dan/atau memperbanyak tanpa izin tertulis dari Penerbit sebagian atau seluruhnya dalam bentuk apa pun.

# Prakata



*Bismillahirrahmannirrahim.*

Segala puji dan syukur yang tak terhingga kami panjatkan ke hadirat Allah swt yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang, karena berkat Rahmat-Nya, buku monografi yang berjudul **“Jintan Hitam: Pencegah Kerusakan Endotel karena Rokok”** dapat diterbitkan.

Konsumsi rokok dan paparan asap rokok baik secara aktif maupun pasif telah terbukti berkaitan dengan sejumlah masalah kesehatan, seperti penyakit jantung koroner, infeksi saluran pernapasan, hingga keganasan atau kanker paru-paru. Khusus pada penyakit jantung koroner, paparan asap rokok termasuk dalam tiga besar faktor risiko pencetus di dunia

serta berkontribusi terhadap 7,2 juta kematian pada tahun 2015. Kendati demikian, data melaporkan terus bertambahnya konsumsi tembakau dan paparan asap rokok di seluruh dunia.

Jintan hitam telah digunakan sebagai obat tradisional di seluruh dunia, terutama di Mediterania yang mengalami penurunan angka kematian akibat penyakit jantung dan pembuluh darah dibandingkan negara-negara Eropa Utara. Telah banyak penelitian yang membuktikan manfaat jintan hitam pada kesehatan berbagai sistem organ, seperti peredaran darah, jantung, paru-paru, hingga imunitas. Terdapat banyak kandungan-kandungan kimiawi pada jintan hitam yang berkontribusi dalam khasiatnya bagi kesehatan. Namun, kandungan-kandungan ini bervariasi pada jintan hitam sesuai dengan daerah penanamannya. Variasi ini tentunya memengaruhi efek biologis dan farmakodinamis jintan hitam pada tubuh.

Keterbatasan referensi yang ada mengenai pengaruh jintan hitam yang dibiakkan secara lokal terhadap pencegahan kerusakan pembuluh darah akibat asap rokok mendorong penulis untuk menyusun buku monografi ini, hingga penulis mengulas khasiat jintan hitam yang ditanam di Indonesia bagi kesehatan pembuluh darah. Hal ini diharapkan dapat menambah khazanah pengetahuan bagi pembaca dan dapat menjadi referensi untuk penelitian lebih lanjut mengenai manfaat jintan hitam lokal.

Pada kesempatan ini, penulis mengucapkan terima kasih pada semua pihak yang telah membantu terwujudnya buku ini. Penulis menyadari bahwa kesempurnaan hanya milik Allah Swt, sehingga tentunya, penulis sangat mengharapkan saran dan masukan demi penyempurnaan buku ini.

Akhir kata, penulis berharap semoga buku ini bermanfaat bagi seluruh pembaca dan dapat menjadi pertimbangan dalam praktik sehari-hari.

## **Penulis**

# Daftar Singkatan



ATP	: Adenosine Triphosphate
bFGF	: Basic Fibroblast Growth Factor
BH <sub>4</sub>	: Tetrahydrobiopterin
COHb	: Karboksihemoglobin
CAT	: Katalase
CO	: Karbon monoksida
COHb	: Karboksihemoglobin
CO <sub>2</sub>	: Karbon dioksida
COX	: Cyclooxygenase
DNA	: Deoxyribonucleic Acid
EDHF	: Endothelium-Derived Hyperpolarising Factor

eNOS	: Endothelial Nitric Oxide Synthase
EPR	: Electron Paramagnetic Resonance
ET-1	: Endothelin-1
FDA	: Food and Drug Administration
FMD	: Flow-Mediated Dilation
GF	: Growth Factor
GSH	: Glutathione
GPx	: Glutathione Peroxidase
HCN	: Hidrogen Sianida
HDL	: High Density Lipoprotein
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrogen Peroksida
H <sub>2</sub> S	: Hidrogen sulfida
hs-CRP	: High Sensitivity C-Reactive Protein
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
HUVEC	: Human Umbilical Vein Endothelial Cells
ICAM-1	: Intercellular Adhesion Molecule-1
IFN	: Interferon
IMT	: Intima Media Thickness
iNOS	: inducible Nitric Oxide Synthases
IRS	: Immunoreactivity Scoring System
LDL	: Low-Density Lipoprotein
MAPK	: Mitogen Activated Protein Kinase
MDA	: Malondialdehyde
METC	: Mitochondrial Electron Transporter Chain
Mg	: Miligram
MMPs	: Matrix Metalloproteinases
Na-CMC	: Natrium-Carboxymethyle Cellulose
NAD <sup>+</sup>	: Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NADH	: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrogen
NADPH	: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NO	: Nitric Oxide
NOS	: Nitric Oxide Synthases
nNOS	: neuronal Nitric Oxide Synthases
O <sub>2</sub>	: Oksigen

Ox-LDL	: Oxidized-Low-Density Lipoproteins
PAH	: Polisiklik Aromatik Hidrokarbon
PAI-1	: Plasminogen Activator Inhibitor-1
PDGF	: Platelet-Derived Growth Factor
PJK	: Penyakit Jantung Koroner
PBS	: Phosphat Buffer Solution
QH <sup>2</sup>	: Oksidasi hidrokuinon
ROS	: Reactive Oxygen Species
SA-HRP	: Streptavidin-Hoseradish Peroxidase
SAT	: Status Antioksidan Total
SOD	: Superoksida Dismutase
TF	: Tissue Factor
TGF- $\beta$	: Transforming Growth Factor- $\beta$
Th1	: Type 1 T Helper Response
Th2	: Type 2 T Helper Response
TLR	: Toll-Like Receptor
TNF- $\alpha$	: Tumor Necrosis Factor- $\alpha$
tPA	: Tissue Plasminogen Activator
TPM	: Total partikulat matter
TSNA	: Tobacco-Spesific Nitrosamines
TxA2	: Thromboxane A2
VCAM-1	: Vascular Adhesion Molecule-1
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor
VSMCs	: Vascular Smooth Muscle Cells
vWF	: Von Willebrand Factor
WHO	: World Health organization



# Daftar Isi



Prakata \_ v

Daftar Singkatan \_ vi

**01**

**PENDAHULUAN \_ 1**

**02**

**KERUSAKAN PEMBULUH DARAH AKIBAT ASAP ROKOK \_ 5**

Struktur Pembuluh Darah \_ 6

Endotelium \_ 8

Disfungsi Endotel \_ 9

<i>Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS)</i>	_ 10
<i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1)</i>	_ 11
Asap Rokok	_ 12
Konstituen Asap Rokok	_ 16
Nikotin	_ 16
Karbon Monoksida (CO)	_ 17
Kuinson	_ 18
Total Particulate Matter (TPM)	_ 18
Akrolein	_ 19
Logam Berat	_ 19
Hidrokarbon Aromatik Polisiklik ( <i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbon/PAH</i> )	_ 20
Radikal Bebas pada Asap Rokok	_ 20
Efek Akut Paparan Asap Rokok terhadap Pembuluh Darah	_ 23
Efek Merokok pada Penyakit Kardiovaskular	_ 31
Aneurisma Aorta Abdominal (AAA) dan Penyakit Arteri Perifer	_ 34
Rehospitalisasi Pasien dengan Gagal Jantung	_ 35
Fibrilasi atrial	_ 35
Tromboemboli Vena	_ 36
Perubahan Kesehatan yang Menguntungkan dari Berhenti Merokok	_ 36
Mekanisme Pengaruh Asap Rokok terhadap Kerusakan Pembuluh Darah dan Gangguan Kardiovaskular	_ 37
Genetika dan Epigenetik dari Penyakit Kardiovaskular Terkait Merokok	_ 38
Sistem Antioksidan	_ 44
Peran Sel-Sel Inflamasi dan Respons Imun	_ 46

## 03

### **JINTAN HITAM \_ 55**

Jintan Hitam	_ 56
Substansi dan Kegunaan Jintan Hitam	_ 58
<i>Thymoquinone</i> , Konstituen Aktif Jintan Hitam	_ 63
Jintan Hitam, Disfungsi Endotel, dan Aterosklerosis	_ 65

# 04

## PEMBERIAN JINTAN HITAM PADA PEMBULUH DARAH TIKUS YANG TERPAPAR ASAP ROKOK \_ 73

Ekstraksi Jintan Hitam dan Penentuan Dosis Terapi \_ 74

Pemaparan Asap Rokok \_ 77

Pemeriksaan Kadar *Endothelial Nitric Oxide Synthase* (eNOS)

Jaringan Aorta \_ 78

Pemeriksaan *Vascular Adhesion Molecule 1* (VCAM-1) Jaringan  
Aorta \_ 79

Pengaruh Paparan Asap Rokok dan Pemberian Ekstrak Jintan Hitam  
pada Pembuluh Darah \_ 80

Pengaruh Paparan Asap Rokok terhadap Kadar eNOS \_ 80

Kadar eNOS setelah Pemberian Ekstrak Jintan Hitam \_ 82

Ekspresi VCAM-1 \_ 84

Hasil Ekspresi VCAM-1 setelah Pemberian Ekstrak Jintan  
Hitam \_ 88

# 05

## PENUTUP \_ 93

Daftar Pustaka \_ 95

Glosarium \_ 105

Indeks \_ 111



# Daftar Gambar



- GAMBAR 1.** Struktur dan lapisan pembuluh darah arteri 7
- GAMBAR 2.** CRP, NO, dan komponen-komponen lain pada proses inflamasi disfungsi endotel 11
- GAMBAR 3.** Pengaruh asap rokok bagi kesehatan tubuh manusia 13
- GAMBAR 4.** Skema jalur kerusakan dinding pembuluh darah akibat paparan asap rokok 14
- GAMBAR 5.** Hasil pengamatan mikroskop dari penampang melintang aorta dengan pembesaran 400x 16
- GAMBAR 6.** Ringkasan jenis dan mekanisme pembentukan ROS dan titik aksi enzim antioksidan 22
- GAMBAR 7.** Pengaruh kandungan asap rokok terhadap proses aterosklerosis 24

- GAMBAR 8.** Penyebab disfungsi endotel adalah adanya ketidakseimbangan Stres Oksidatif dan Aktivitas Oksida Nitrat 26
- GAMBAR 9.** Generasi Spesies Oksigen Reaktif 27
- GAMBAR 10.** Beberapa struktur kausal yang jelas yang dapat menjelaskan hubungan antara merokok tembakau, metilasi F2RL3, dan risiko penyakit kardiovaskular 42
- GAMBAR 11.** Bunga Jintan Hitam 56
- GAMBAR 12.** Biji Jintan Hitam 57
- GAMBAR 13.** Jalur biosintesis *thymoquinone* 64
- GAMBAR 14.** Hasil pengamatan ekspresi M1 dengan marka CD38 71
- GAMBAR 15.** Hasil pengamatan ekspresi M2 dengan marka *Egr-2* 71
- GAMBAR 16.** Hasil pengamatan ekspresi M2 dengan marka *Egr-2* 72
- GAMBAR 17.** Ilustrasi Tindakan Pemberian Asap dalam Ruangan Tertutup pada Tikus 78
- GAMBAR 18.** Hasil pengamatan ekspresi VCAM-1 aorta 86
- GAMBAR 19.** Hasil pengamatan ekspresi VCAM-1 aorta 87
- GAMBAR 20.** Hasil analisa jalur jintan hitam terhadap variabel penelitian 89
- GAMBAR 21.** Observasi mikroskopis struktur aorta 91

# 01

## Pendahuluan



Lebih dari 7 juta kematian per-tahun di dunia disebabkan oleh paparan Lasap rokok.<sup>1</sup> Tjandra pada studinya di tahun 2002 melaporkan bahwa terdapat 1 miliar perokok aktif di seluruh dunia, setara dengan 1/7 dari populasi manusia.<sup>2</sup> Indonesia menduduki peringkat keempat negara dengan konsumsi tembakau tertinggi,<sup>3</sup> dengan jumlah perokok yang terus meningkat sejak 2013 pada remaja usia 10-18 tahun, yaitu 7,2% (Riskesdas, 2013), 8,8% (Sirkesnas, 2016), dan 9,1% (Riskesdas, 2018).<sup>4</sup> Merokok, baik secara aktif maupun pasif, telah dikaitkan dengan sejumlah kondisi gangguan kesehatan, di antaranya penyakit jantung, infeksi saluran pernapasan, hingga kanker paru. Pada penyakit jantung koroner, merokok adalah salah satu dari tiga besar penyebab tersering yang dapat dicegah.<sup>5</sup>

Mekanisme terjadinya penyakit jantung koroner akibat paparan asap rokok dimulai dengan kerusakan pembuluh darah. Rokok mengandung 7.000 jenis bahan kimia yang bisa mempersempit arteri dan menyebabkan disfungsi pada lapisan endotel pembuluh darah.<sup>3,5</sup> Disfungsi pada lapisan endotel dipicu oleh keadaan stres oksidatif yang disebabkan tingginya zat-zat prooksidan komponen asap rokok pada tubuh. Stres oksidatif akan menyebabkan peroksidasi lipid yang merusak sel dan menghasilkan *Malonaldehyde* (MDA). Disfungsi endotel juga melibatkan penurunan enzim *Endothelial Nitric Oxide Synthase* (eNOS), yang selanjutnya menyebabkan penurunan ketersediaan *Nitric Oxide* (NO). Penurunan NO, selain menyebabkan penurunan aktivitas antioksidan, juga berdampak pada menurunnya aktivitas antiinflamasi dan antitrombotik pada pembuluh darah. Turunnya kadar NO turut meningkatkan permeabilitas endotel, mempermudah pergerakan sitokin-sitokin proinflamasi dan ekspresi molekul adhesi seperti *Vascular Adhesion Molecule-1* (VCAM-1) yang mampu mengikat sel monosit dan sel-sel inflamasi lain. Peningkatan VCAM-1 berperan dalam meningkatkan aktivasi dan adhesi makrofag pada endotel yang kemudian memicu proses inflamasi. Serangkaian proses ini menyebabkan aterosklerosis, sebuah kondisi saat pembuluh darah menyempit akibat penimbunan lipid dan jaringan fibrosa yang dimediasi oleh respons-respons inflamasi tersebut.<sup>5,6,7,8</sup> Aterosklerosis merupakan penyebab utama dari Penyakit Jantung Koroner.<sup>9</sup>

Dewasa ini, penurunan angka kematian terkait penyakit jantung dan pembuluh darah di Mediterania dibandingkan dengan negara-negara Eropa Utara dikaitkan dengan pola asupan makanan dan minuman Mediterania yang kaya akan antioksidan.<sup>10</sup> Salah satu bahan alami kaya antioksidan yang kerap digunakan sebagai bahan makanan di Mediterania adalah jintan hitam (*Nigella sativa*). Jintan hitam, juga dikenal sebagai *Habbatus Sauda*, *Alhabahat Alsawda*, atau *Alkamoun Alaswad*, memiliki reputasi sebagai tanaman ajaib di kalangan kaum Muslim.<sup>11</sup> Nabi Muhammad *Shallallahu 'alaihi wa salam* bersabda dalam hadis riwayat Al Bukhari 71:591, 592 dan Muslim 26:5489 bahwa “Dalam benih hitam ada penyembuhan untuk setiap penyakit kecuali kematian”. Biji jintan hitam merupakan salah satu komponen obat yang umum digunakan dalam sistem Ayurveda dan *Tibbe-*

*nabvi* (pengobatan nabu). Jintan hitam dan komponen turunannya, terutama *thymoquinone*, memiliki potensi *radical scavenging* serta penghambatan stres oksidatif dengan cara meningkatkan produksi enzim antioksidan.<sup>12</sup> Selain itu, Jintan hitam juga telah diketahui memiliki berbagai kandungan yang berpotensi untuk menghambat proses awal munculnya aterosklerosis, yaitu pada tahap disfungsi endotel, melalui berbagai macam mekanisme seperti mekanisme antiinflamasi maupun antitrombotik.<sup>13</sup>

Kemampuan-kemampuan jintan hitam ini menunjukkan potensi untuk pemanfaatannya sebagai pencegahan kerusakan pembuluh darah, hingga penyakit-penyakit yang disebabkan oleh kerusakan pembuluh darah.<sup>14</sup> Namun, hingga saat penulisan buku ini belum ada publikasi penelitian-penelitian yang membuktikan pengaruh pemberian jintan hitam ini dalam pencegahan kerusakan pembuluh darah akibat paparan asap rokok, terutama menggunakan jintan hitam yang dibiakkan secara lokal di Indonesia.

Atas dasar ini penulis melakukan penelitian untuk mengetahui efek pemberian jintan hitam, sehingga diharapkan dapat memberikan informasi baru terutama dalam penyakit pembuluh darah dan paparan asap rokok. Buku ini berdasarkan penelitian eksperimental yang menggunakan subjek tikus Wistar yang diberi paparan asap rokok. Beberapa kelompok tikus dengan perlakuan dosis jintan hitam yang berbeda-beda akan dilakukan pemeriksaan jaringan untuk melihat aktivitas sel-sel inflamasi.



# 02

## Kerusakan Pembuluh Darah Akibat Asap Rokok



Pembuluh darah pada tubuh manusia memiliki peranan yang sangat penting karena bertugas untuk memfasilitasi peredaran darah dan pertukaran zat-zat kimiawi pada tubuh, termasuk *nutrient*, oksigen, dan senyawa-senyawa farmakologis. Struktur pembuluh darah tersusun dari lapisan-lapisan jaringan yang dapat berbeda pada setiap jenis dan lokasi pembuluh darah. Pembuluh darah besar, baik arteri maupun vena besar, tersusun dari 3 lapisan yaitu tunika intima, tunika media, dan tunika adventisia. Tunika intima adalah lapisan terdalam pada dinding pembuluh darah yang terpapar dan berinteraksi langsung dengan isi lumen. Tunika intima terdiri dari sebuah lapisan yang disusun oleh sel-sel endotel atau endotelium.

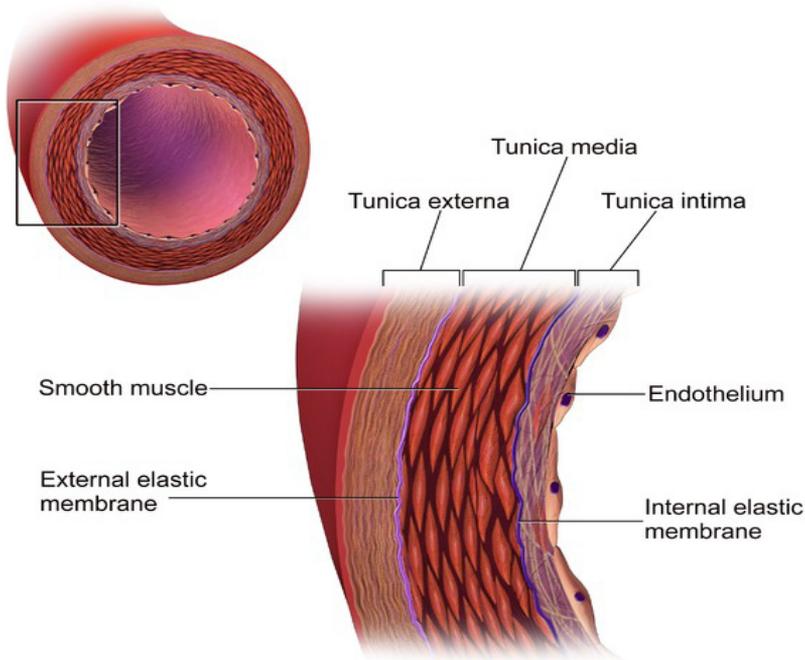
Rokok mengandung 7.000 jenis bahan kimia yang bisa mempersempit arteri dan menyebabkan disfungsi pada lapisan endotel pembuluh darah.<sup>3,5</sup> Disfungsi pada lapisan endotel dipicu oleh keadaan stres oksidatif yang disebabkan tingginya zat-zat prooksidan komponen asap rokok pada tubuh. Stres oksidatif akan menyebabkan peroksidasi lipid yang merusak sel dan terjadinya serangkaian proses inflamasi di lapisan endotel. Serangkaian proses ini menyebabkan aterosklerosis, sebuah kondisi saat pembuluh darah menyempit akibat penimbunan lipid dan jaringan fibrosa yang dimediasi oleh respons-respons inflamasi tersebut.<sup>5,6,7,8</sup> Aterosklerosis merupakan penyebab utama dari Penyakit Jantung Koroner.<sup>9</sup>

## 1. STRUKTUR PEMBULUH DARAH

Pembuluh darah pada tubuh manusia dianalogikan sebagai sebuah pipa ketika darah sebagai pembawa nutrisi dan bahan lain yang dibutuhkan tubuh mengalir. Fungsi utama pembuluh darah adalah untuk memfasilitasi peredaran darah dan pertukaran zat-zat kimiawi pada tubuh, termasuk *nutrient*, oksigen, dan senyawa-senyawa farmakologis. Selain itu, salah satu fungsi utama pembuluh darah adalah memodulasi hemostasis melalui substansi-substansi yang dihasilkan oleh endotel, lapisan yang bersinggungan langsung dengan rongga atau lumen pembuluh darah. Pembuluh darah merupakan salah satu komponen penyusun sistem sirkulasi tubuh bersama dengan jantung dan pembuluh limfatik.<sup>15</sup>

Secara histologi, sistem pembuluh darah dibagi menjadi makrovaskulatur (semua pembuluh darah yang kasat mata) dan mikrovaskulatur (pembuluh darah yang berukuran lebih kecil dari 100 mikron). Pembuluh darah arteri dapat dibagi lagi menjadi arteri besar (aorta dan arteri pulmonal), arteri sedang, arteri kecil dan arteriol, begitu pun juga vena yang dapat dibagi menjadi vena besar, sedang, kecil, dan venula. Struktur pembuluh darah tersusun dari lapisan-lapisan jaringan yang dapat berbeda pada setiap jenis dan lokasi pembuluh darah. Pembuluh darah besar, baik arteri maupun vena besar, tersusun dari 3 lapisan yaitu tunika intima, tunika media, dan tunika adventisia seperti yang tampak pada Gambar 1.<sup>15,16</sup>

## The Structure of an Artery Wall



**GAMBAR 1.** Struktur dan lapisan pembuluh darah arteri.<sup>16</sup>

Lapisan pembuluh darah yang terletak paling luar adalah tunika eksterna atau tunika adventisia. Tunika adventisia bertanggung jawab akan integritas pembuluh darah dan dapat menahan tegangan fisik dinding pembuluh darah. Pada lapisan ini terdapat pembuluh darah yang lebih kecil (*vasa vasorum*) serta saraf pembuluh darah (*nevi vasorum*) yang bertanggung jawab akan sel-sel pada dinding pembuluh darah itu sendiri. Kolagen merupakan konstituen yang fundamental pada tunika eksterna dan berperan untuk memfasilitasi penempelan pembuluh darah pada jaringan sekitar.<sup>15</sup>

Tunika media adalah lapisan tengah pada dinding pembuluh darah. Lapisan tersusun dari jaringan sel-sel otot polos yang dapat mengubah rongga atau lumen pembuluh darah. Ketebalan tunika media berbeda-

beda pada setiap jenis pembuluh darah. Pada pembuluh darah arteri, terutama arteri besar seperti aorta dan arteri pulmonal, lapisan tunika media memiliki ketebalan yang lebih dibandingkan tunika media pada pembuluh vena. Tunika media diselimuti oleh membran elastis eksterna yang memisahkan lapisan ini dengan tunika eksterna.<sup>15</sup>

Tunika intima adalah lapisan terdalam pada dinding pembuluh darah yang terpapar dan berinteraksi langsung dengan isi lumen. Tunika intima terdiri dari sebuah lapisan yang disusun oleh sel-sel endotel atau endotelium dan dipisahkan oleh membran elastis interna dengan tunika media.<sup>16</sup>

### a. Endotelium

Lapisan endotelium pembuluh darah adalah sebuah lapisan tipis yang melapisi bagian dalam pembuluh darah. Sel endotel yang menyusun endotelium bersifat datar dengan inti sel tunggal, berbentuk sedikit lonjong dengan ketebalan sekitar 0,2 hingga 2  $\mu\text{m}$  dan lebar 1 hingga 20  $\mu\text{m}$ .<sup>16</sup>

Fungsi utama endotel adalah mengontrol homeostasis, regulasi persinyalan intraseluler, menjaga tonus dan permeabilitas pembuluh darah, koagulasi, serta angiogenesis. Endotel melepaskan zat autokrin dan parakrin dalam menanggapi rangsangan dari luar dan memicu respons inflamasi dengan pelepasan sel-sel limfosit, monosit, trombosit, dan VEGF.<sup>17</sup> Endotel memiliki beberapa peranan yang krusial dalam pertahanan terhadap pertukaran cairan, elektrolit, molekul makro, dan seluler antara ruang intravaskular dan ekstravaskular, mengatur fungsi otot polos tunika media melalui sintesis substansi-substansi vasoaktif terutama NO, Prostasiklin (PGI<sub>2</sub>), dan Endotelin-1, memodulasi agregasi platelet melalui sintesis NO dan PGI<sub>2</sub>, serta memodulasi migrasi transendotelial dengan NO dan ekspresi molekul-molekul adhesi. Sel endotel pembuluh darah dapat memproduksi NO secara terus menerus, dan produksi ini dapat ditingkatkan oleh pengikatan agonis spesifik seperti asetilkolin dan bradikinin pada reseptor-reseptor endotel, peningkatan gaya lintang pada permukaan endotel, dan rangsangan sitokin-sitokin seperti *tumor necrosis*

*factor* (TNF) dan interleukin yang dikeluarkan leukosit saat proses inflamasi dan infeksi berlangsung. NO dapat dengan cepat berdifusi keluar dari sel endotel untuk memicu relaksasi otot polos atau menghalangi agregasi platelet dalam darah. NO endotel juga mencegah ekspresi molekul-molekul adhesi yang terlibat dalam perlekatan leukosit ke permukaan endotel. Oleh karena itu, NO endotel berperan dalam relaksasi otot polos, meng-inhibisi fungsi platelet, dan menghalangi respons inflamasi.<sup>15</sup>

## **b. Disfungsi Endotel**

Homeostasis pembuluh darah memerlukan keseimbangan antara vasodilatasi dan vasokonstriksi yang dipengaruhi oleh NO, prostasiklin, *Atrial Natriuretic Peptide* (ANP), *Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor* (EDHF), dan adrenomedulin sebagai modulator vasodilatasi serta ET-1, angiotensin II, tromboksan A<sub>2</sub>, dan prostaglandin H<sub>2</sub> sebagai modulator vasokonstriksi.<sup>18</sup> Disfungsi endotel terjadisaat bioavailabilitas vasodilator-vasodilator tersebut, khususnya NO, menurun dan atau adanya peningkatan faktor-faktor vasokonstriktor yang dihasilkan endotel.<sup>19</sup> Ketidakseimbangan ini menyebabkan terganggunya fungsi endotel dalam meregulasi vasodilatasi pembuluh darah. Keadaan ini juga menimbulkan kondisi endotel yang teraktivasi, saat proses inflamasi, proliferasi, dan prokoagulasi meningkat dan memicu terbentuknya pembentukan plak pada pembuluh darah.<sup>18,20</sup> Proses inflamasi dan koagulasi kronis yang disebabkan disfungsi endotel ditandai dengan ekspresi molekul-molekul adhesi seperti *E-selectin*, *P-selectin*, *ICAM-1*, dan *VCAM-1* di permukaan sel, memfasilitasi perekutan dan perlekatan sel inflamasi.<sup>21</sup> Disfungsi endotel juga ditandai dengan terganggunya produksi *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) sebagai faktor permeabilitas pembuluh darah yang berperan dalam angiogenesis, proliferasi, dan migrasi sel endotel.<sup>17</sup>

Disfungsi endotel dipicu oleh berbagai faktor risiko kardiovaskuler, termasuk yang dapat diubah seperti merokok, hiperkolesterolemia, hipertensi, hiperglisemia, dan yang tidak dapat diubah seperti usia lanjut dan riwayat keluarga dengan penyakit aterosklerotik dini.<sup>22,23,24</sup> Keterkaitan disfungsi endotel dalam perkembangan penyakit jantung dan pembuluh

darah ini membuat disfungsi endotel menjadi faktor prediktor yang paling sering dan paling awal ditemukan pada perkembangan penyakit pembuluh darah, seperti penyakit jantung koroner.<sup>25</sup> Selain itu, disfungsi endotel juga dikaitkan dengan berbagai permasalahan kesehatan lain seperti diabetes dan hipertensi.

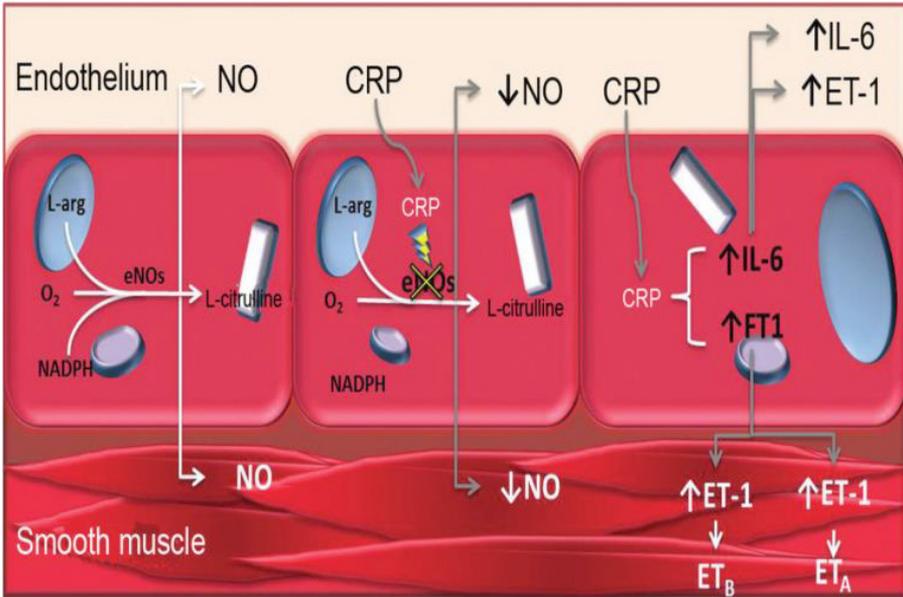
### c. *Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS)*

*Nitric Oxide Synthase* (NOS) merupakan enzim yang berperan dalam pembentukan NO. Tiga isoform NOS meliputi NOS neuronal (nNOS), NOS yang dapat diinduksi (*inducible NOS/iNOS*), dan eNOS yang paling banyak didapatkan pada sel endotel.<sup>21</sup> Dalam endotel yang sehat, eNOS bertanggung jawab atas sebagian besar produksi NO pembuluh darah.<sup>26</sup>

eNOS adalah sitokrom P450 seperti enzim reduktase yang membutuhkan kofaktor seperti *tetrahydrobiopterin* (BH4), nukleotida flavin dan NADPH untuk transfer electron ke nitrogen guanindin dari L-arginin dan membentuk NO.<sup>27</sup> Keterbatasan substrat L-arginin dan kofaktor BH4 akan mengurangi oksigen molekuler pada L-arginin dan memproduksi O<sub>2</sub>- yang disebut juga sebagai fenomena '*eNOS uncoupling*'.<sup>10,27</sup> Proses ini berperan dalam disfungsi endotel melalui peningkatan stres oksidatif.<sup>10</sup> eNOS penting dalam memengaruhi bioavailabilitas NO dalam menurunkan antioksidan, efek antiinflamatori dan aktivitas antitrombosis dalam pembuluh darah.<sup>47</sup>

*C-reactive protein* (CRP), sebuah protein anular pentamerik yang berikatan dengan fosfokolin di permukaan sel yang mati atau sekarat, meningkat sebagai respons terhadap inflamasi dan menjadi salah satu biomarka yang sensitif dalam identifikasi proses inflamasi. CRP melemahkan aktivitas eNOS sehingga turut mengurangi ketersediaan NO endotel sebagai vasodilator dan meningkatkan konsentrasi ET-1 sebagai vasokonstriktor.<sup>28</sup>

Penurunan eNOS menyebabkan peningkatan ekspresi molekul adhesi, salah satunya VCAM-1.<sup>29</sup>



**GAMBAR 2.** CRP, NO, dan komponen-komponen lain pada proses inflamasi disfungsi endotel.<sup>24</sup>

#### d. *Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1)*

*Vascular Cell Adhesion Molecule 1* atau VCAM-1 merupakan salah satu molekul adhesi yang mirip dengan imunoglobulin dan diekspresikan pada sel endotel yang teraktivasi. Secara molekuler, VCAM-1 berikatan dengan integrin  $\alpha 4\beta 1$  yang diekspresikan di limfosit, monosit, dan eosinofil. VCAM-1 memediasi adhesi baik tipe *rolling* maupun tipe langsung, tergantung pada aviditas integrin  $\alpha 4\beta 1$ . Secara struktur, VCAM-1 mirip dengan molekul adhesi endotel lain, namun pola regulasinya berbeda.<sup>30</sup>

VCAM-1 tidak diekspresikan dalam kondisi fisiologis, namun hanya pada kondisi patologis yang diinduksi pada lingkungan proaterosklerotik dan disfungsi endotel. Peningkatan VCAM-1 dapat memicu aktivasi dan adhesi makrofag pada endotel yang kemudian mengaktifkan proses inflamasi.<sup>6,7,8,9</sup>

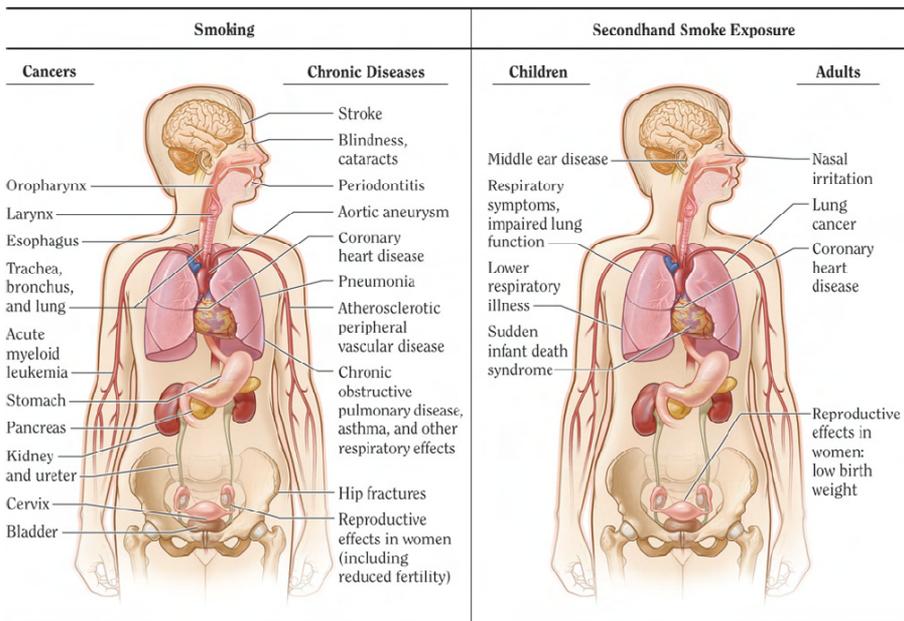
## 2. ASAP ROKOK

Asap rokok yang dihirup ke mulut perokok aktif dikenal sebagai asap *mainstream*, sedangkan asap yang keluar dari ujung rokok yang terbakar disebut asap *sidestream*. Asap *sidestream* mengandung konsentrasi gas beracun yang lebih tinggi daripada *mainstream*, seperti hidrokarbon aromatik polisiklik (*Polycyclic Aromatic Hydrocarbon/PAH*) dan nitrosamin volatil. Sementara itu, asap rokok yang ada pada peredaran udara di lingkungan dihasilkan dari kombinasi asap *sidestream* sebesar 85% dan asap *mainstream* sebesar 15%. Asap rokok dapat dibedakan menjadi dua fase, yaitu fase tar, yang menyusun 8% dari keseluruhan asap rokok *mainstream*, dan fase gas, yang menyusun 92% dari keseluruhan asap *mainstream*. Fase tar atau fase artikel adalah sejumlah material yang terperangkap pada filter serat kaca *Cambridge*. Fase gas adalah material yang lolos melewati filter. Fase tar mengandung  $10^{17}$  radikal bebas per gram dan fase gas mengandung  $10^{15}$  radikal bebas pada tiap hembusannya. Radikal bebas yang terkandung dalam fase tar berumur kurang lebih dalam hitungan jam hingga bulan, sedangkan radikal bebas dari fase gas memiliki rentang waktu yang pendek yaitu dalam hitungan detik.<sup>31,32,33,34</sup>

Tingginya kandungan radikal bebas yang ada asap rokok sangat merugikan. Merokok dapat menyebabkan ketidakseimbangan antara prooksidan dan antioksidan sehingga menyebabkan stres oksidatif yang kemudian meningkatkan peroksidasi lipid, kerusakan oksidatif DNA, dan gangguan antioksidan enzimatis.<sup>35</sup> Paparan rokok, baik aktif maupun pasif, telah terbukti berkaitan dengan sejumlah permasalahan kesehatan, antara lain penyakit jantung koroner, infeksi saluran pernapasan, hingga kanker paru. Pengaruh asap rokok bagi Kesehatan dapat dilihat lebih jelas dan lengkap pada Gambar 3.

Mekanisme kerusakan sistem jaringan tubuh akibat asap rokok dapat disebabkan oleh disfungsi endotel.<sup>29</sup> Paparan asap rokok menurunkan kemampuan vasodilatasi pembuluh darah, sebuah marker awal dari kerusakan pembuluh darah dan aterosclerosis. Sejumlah penelitian eksperimental membuktikan bahwa fenomena ini berkaitan dengan penurunan bioavailabilitas NO di pembuluh darah.<sup>37</sup> Anion superoksida yang ada pada asap rokok telah terbukti berperan dalam penurunan NO

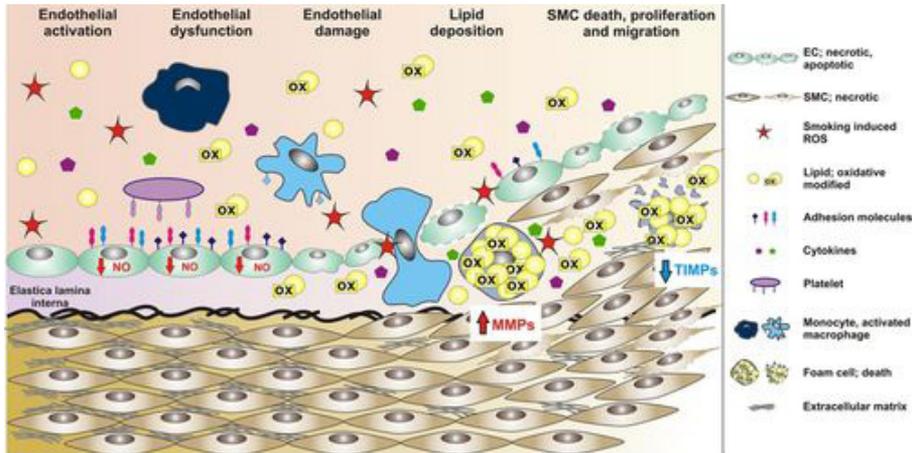
dengan membentuk senyawa peroksinitrit.<sup>38</sup> Selain itu, *Reactive Oxygen Species* (ROS) lain yaitu  $H_2O_2$  juga merupakan penginduksi potensial kenaikan eNOS.<sup>39</sup> Pada penyakit diabetes, jalur protein kinase-C (PKC) juga kerap dikaitkan dengan peningkatan ekspresi eNOS, anion superoksida, dan  $H_2O_2$ .<sup>40,41,42</sup>



**GAMBAR 3.** Pengaruh asap rokok bagi kesehatan tubuh manusia.<sup>36</sup>

Stres oksidatif yang disebabkan paparan asap rokok memicu aktivasi endotelium dengan induksi ekspresi molekul-molekul adhesi seperti VCAM-1 dan *Intracellular Adhesion Molecule* (ICAM), serta makrofag dan platelet. Aktivasi endotel melibatkan penurunan level NO dalam sel dan mengakibatkan terganggunya fungsi sel otot polos di tunika media. Paparan asap rokok menyebabkan produksi sitokin-sitokin inflamasi dan proaterogenik oleh endotel, yang berujung pada disfungsi endotel. Selain itu, konstituen dalam asap rokok memproduksi ROS yang menyebabkan kematian sel endotel dengan cara apoptosis atau nekrosis.<sup>37</sup>

Makrofaq juga teraktivasi dengan adanya ekspresi reseptor-reseptor molekul adhesi yang ada pada sel-sel endotel. Makrofaq menyerap lipid yang teroksidasi hasil modifikasi oksidatif yang ditingkatkan oleh asap rokok setelah adhesi dan migrasi transendotelial. Penyerapan lipid yang dimediasi oleh reseptor *scavenger* menginduksi formasi *foam cell* pada dinding aorta, dan kematian *foam cell* ini menginduksi pembentukan plak kaya lemak pada aorta.<sup>37</sup>



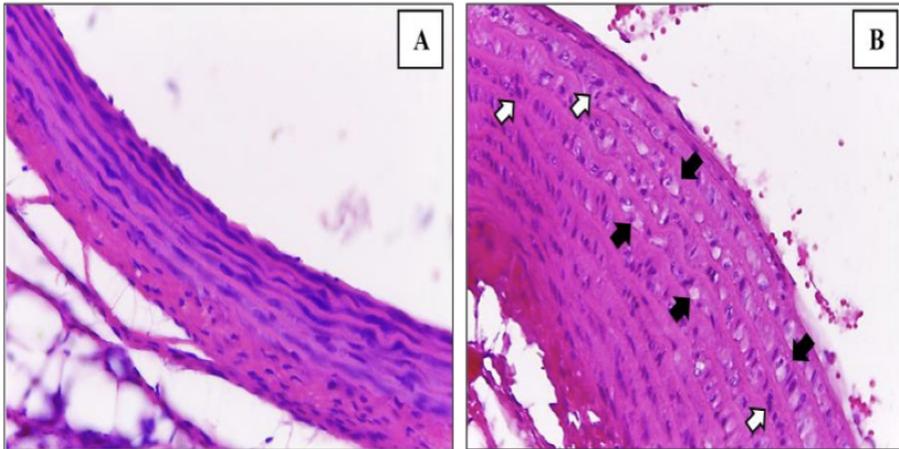
**GAMBAR 4.** Skema jalur kerusakan dinding pembuluh darah akibat paparan asap rokok.<sup>43</sup>

Asap rokok juga ditengarai memicu peningkatan proliferasi dan migrasi sel otot polos yang menyebabkan penebalan tunika intima dan formasi plak. Nekrosis pada sel otot polos lebih lanjut memicu peningkatan sinyal-sinyal inflamasi, termasuk enzim-enzim proteolitik intraseluler yang menyebabkan pembelahan protein-protein matriks ekstraseluler. Kerusakan protein matriks ekstraseluler ini diperparah dengan peningkatan ekspresi *Matrix Metalloproteinase* (MMP) dan mengurangi ekspresi inhibitor MMP jaringan (TIMP).<sup>37</sup> Mekanisme ini secara ringkas dapat dilihat pada Gambar 4.

Paparan asap rokok juga memengaruhi struktur histologi aorta. Sejumlah penelitian menemukan adanya perubahan struktural pada aorta yang ditandai adanya disorganisasi dan vakuolisasi sel otot polos pada tunika media vakuolisasi adalah salah satu efek dari proses sitotoksik dalam sel dan merupakan tanda awal dari apoptosis sel. Komponen kimia dalam obat-obatan dan polutan dapat menyebabkan stres oksidatif yang ditandai adanya vakuolisasi permanen di dalam sel. Vakuolisasi membuat sel otot polos dalam tunika media memiliki bentuk dan ukuran yang berbeda, sehingga membuat susunan sel menjadi tidak teratur atau yang disebut dengan disorganisasi.

*Intima-Media Thickness* (IMT) pada sejumlah penelitian meningkat pada grup perlakuan, seperti pada penelitian yang dilakukan oleh Ali *et al.* pada tahun 2012. Peningkatan IMT pada pembuluh darah disebabkan adanya kondisi patologis yang menyebabkan banyaknya sel yang mengalami apoptosis dan sebagian sel yang lain akan berproliferasi secara berlebihan sebagai mekanisme kompensasi.<sup>38</sup> Peningkatan IMT adalah gambaran dari disfungsi endotel yang merupakan tanda aterosklerosis dini pada paparan asap rokok.<sup>39,40</sup> Kondisi inilah yang mendasari disfungsi endotel akibat paparan asap rokok.

Selain digunakan pada studi praklinis, pengukuran IMT juga sering digunakan sebagai parameter evaluasi pada penelitian klinis. Studi suplementasi antioksidan kombinasi vitamin C dan E pada perokok menggunakan IMT sebagai parameter evaluasi untuk progresivitas plak aterosklerosis selama tiga tahun. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa pemberian antioksidan dapat menurunkan ketebalan IMT hingga 74% jika dibandingkan dengan plasebo.<sup>40,41</sup>



**GAMBAR 5.** Hasil pengamatan mikroskop dari penampang melintang aorta dengan pembesaran 400x. (A) Pada aorta tikus *wistar* tanpa paparan asap rokok, dan (B) Pada aorta tikus *wistar* dengan paparan asap rokok, tampak disorganisasi (panah putih) dan vakuolisasi (panah hitam) dari sel otot polos dalam tunika media.<sup>82</sup>

### 3. KONSTITUEN ASAP ROKOK

Konstituen kimia fase gas asap rokok meliputi nitrogen ( $N_2$ ), oksigen ( $O_2$ ), karbon dioksida ( $CO_2$ ), karbon monoksida (CO), asetaldehid, formaldehid, metana, hidrogen sianida (HCN), asam nitrat, aseton, akrolein, ammonia, methanol, hidrogen sulfide ( $H_2S$ ), PAH seperti benzopiren, nitrosamin, dan senyawa karbonil.<sup>25</sup>

Konstituen kimia fase tar asap rokok meliputi asam karboksilat, fenol, air, humektan, nikotin, terpenoid, lilin parafin, nitrosamin spesifik tembakau (*Tobacco-Specific Nitrosamine/TSNA*), katekolamin, dan bahan lain termasuk pelarut yang menyusun *Total Particulate Matter* (TPM).<sup>25</sup>

#### a. Nikotin

Alkaloid yang terkandung di daun tembakau antara lain yaitu antabin, anabasin, N-metilanabasin, nikotin, N-oksida, miosmin,  $\beta$ -nikotirin, kotinin, nornikotin, dan 2,3'-bipiridil. Kadar nikotin yang terkandung

dalam asap rokok *mainstream* lebih tinggi dibandingkan pada asap rokok *sidestream*. Kandungan nikotin dalam tembakau berkisar dari 6 hingga 18 miligram per gram, sementara kadar nikotin yang diserap dari setiap batang rokok adalah 1 hingga 2 miligram.<sup>25</sup>

Nikotin dapat meningkatkan detak jantung melalui sistem saraf simpatik dan menyebabkan adiksi yang disebabkan kemiripan molekul nikotin dengan asetilkolin, yaitu neurotransmitter otak.<sup>25,34</sup>

Nikotin juga dapat menyebabkan gangguan vasodilatasi endotel melalui peningkatan stres oksidatif yang dapat dinilai melalui dilatasi termediasi aliran (*flow-Mediated Dilation/FMD*) menggunakan ultrasound. Paparan nikotin pada sel endotel secara *in vitro* dan *in vivo* meningkatkan produksi  $O_2^-$  dan adhesi monosit pada endotel.<sup>31</sup> Nikotin merangsang makrofag untuk mensekresi sitokin inflamasi seperti *Tumor Necrotizing Factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), dan kemokin di subendotel.<sup>32</sup> Nikotin juga menyebabkan adhesi leukosit, aktivasi trombosit, dan merangsang koagulasi serta menurunkan fibrolisis.<sup>33</sup>

Nikotin meningkatkan kapasitas sel dendritik untuk merangsang proliferasi sel T dan sitokin. Nikotin juga memengaruhi sel dendritik untuk meningkatkan sekresi sitokin Interleukin-12 (IL-12). Paparan jangka panjang nikotin juga dapat merusak angiogenesis serta meningkatkan neovaskularisasi dan perkembangan plak aterosklerosis.<sup>25</sup>

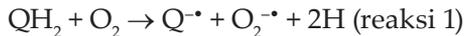
## **b. Karbon Monoksida (CO)**

Gas CO dalam asap rokok dapat mengikat hemoglobin (Hb) membentuk karboksihemoglobin (COHb), sehingga menurunkan kadar hemoglobin untuk membawa oksigen. Paparan CO jangka panjang pada perokok mengakibatkan massa sel darah merah menjadi lebih besar dan mengurangi kapasitas pengangkutan oksigen sel darah merah yang menyebabkan hipoksia relatif. Keadaan hipoksia relatif ini menyebabkan peningkatan viskositas darah dan hiperkoagulasi pada perokok. Rata-rata kadar COHb pada perokok yaitu sekitar 5%, sedangkan pada perokok berat menjadi 10% atau lebih tinggi.<sup>25</sup>

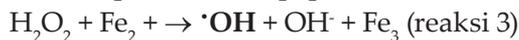
### c. Kuinon

Kuinon memiliki sifat toksik karena mampu menghasilkan ROS sebagai produk sampingan. Kuinon yang berasal dari asap rokok menjalani siklus reduksi oksidasi dengan memasuki jalur NADPH reduktase.<sup>43</sup>

Oksidasi hidrokuinon (QH<sup>2</sup>) oleh molekul oksigen dalam larutan cair menghasilkan semikuinon (Q<sup>•-</sup>) dan O<sub>2</sub><sup>•-</sup> setelah reaksi 1:



Superoksida dismutase (SOD) merupakan enzim yang melindungi sel dari toksisitas ROS selama respirasi aerobik, dengan cara mengonversi O<sub>2</sub><sup>•-</sup> radikal yang lebih toksik menjadi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang memiliki toksisitas lebih rendah (reaksi 2).<sup>44</sup> Hidrogen Peroksida bersama dengan ion logam transisi, mengalami disproporsi menghasilkan hidroksil radikal yang merupakan oksidan kuat (reaksi 3).<sup>43</sup>



Metode polarografi Nakayama *et al.* pada tahun 1989 menemukan bahwa ekstrak tar rokok menghasilkan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang terbentuk dari O<sub>2</sub><sup>•-</sup> yang merupakan pengurangan oksigen atmosfer oleh radikal semikuinon di dalam kandungan tar. Kadar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> setelah 4 jam berkisar antara 37 hingga 123 μM per batang rokok dan bervariasi tergantung jenis rokoknya.<sup>43</sup>

Prof William A. Pryor dari *Louisiana State University* menggunakan *Electron Paramagnetic Resonance (EPR) spectroscopy* untuk menunjukkan radikal bebas fase tar asap rokok seperti hidrokuinon dan katekol berhubungan berbagai macam penyakit akibat rokok salah satunya adalah aterosklerosis.<sup>43</sup>

### d. Total Particulate Matter (TPM)

*Total Particulate Matter* adalah campuran yang sangat kompleks dan terdiri dari banyak senyawa fenolik tersubstitusi seperti dihidroksibenzena dan

turunannya, serta hidrokuinon dan katekol.<sup>43</sup> Radikal bebas dalam TPM asap rokok lebih stabil dan bertahan untuk jangka waktu yang lama. Konsentrasi radikal bebas dalam TPM sekitar  $10^{17}$  radikal bebas per gram TPM yang tergantung pada jenis tembakau, jenis rokok, dan regimen rokok.<sup>43</sup>

#### e. Akrolein

Akrolein adalah aldehid reaktif yang dihasilkan dari peroksidasi lipid endogen pada perokok. Akrolein menyebabkan oksidasi protein antioksidan seluler seperti thioredoxins 1 dan 2 pada sel endotel. Thioredoxins adalah protein antioksidan yang mengatur keseimbangan oksidasi dan reduksi pada sel normal. Oksidasi thioredoxins menyebabkan disfungsi dan kematian sel endotel pada aterosklerosis. Akrolein menginduksi produksi enzim cyclooxygenase-2 (COX-2) pada lesi aterosklerotik di sel endotel manusia yang dilakukan secara *in vitro*. Akrolein juga berkontribusi pada trombogenesis pada perokok dengan menghambat aktivitas antitrombin.<sup>25,43</sup>

Akrolein dapat mengaktifkan NADPH oksidase dan meningkatkan produksi  $O_2^-$  endotel dan mengurangi bioavailabilitas NO sehingga terjadi disfungsi endotel.<sup>45</sup>

#### f. Logam Berat

Tanaman tembakau mengangkut ion logam dari tanah melalui akar ke daun, seperti logam kadmium, timbal, merkuri, arsen, besi, tembaga, kromium, nikel, dan selenium. Sejumlah logam berat menumpuk di daun dan diproses menjadi asap *mainstream*.<sup>43</sup> Logam dalam asap rokok mengkatalisis oksidasi protein seluler yang menyebabkan disfungsi endotel, dan pelepasan sel endotel dari dinding pembuluh darah.<sup>25</sup>

Stres oksidatif yang diinduksi logam seperti besi, tembaga, nikel, dan kromium, bereaksi dengan molekul organik membentuk siklus redoks. Logam seperti besi dan tembaga pada fase tar dari asap rokok dapat mempromosikan pembentukan OH melalui reaksi Fenton dalam jaringan

hidup. Sedangkan logam yang tidak aktif seperti timah, kadmium, dan merkuri mengurangi aktivitas dari enzim antioksidan. Logam dalam asap rokok berpotensi menyebabkan peningkatan ROS pada perokok terutama melalui jalur eksogen.<sup>43</sup>

#### **g. Hidrokarbon aromatik polisiklik (*Polycyclic Aromatic Hydrocarbon/PAH*)**

Hidrokarbon aromatik polisiklik adalah komponen fase tar asap rokok yang juga terbukti menginduksi aterosclerosis. Injeksi mingguan PAH seperti benzo-[a]-piren dan 7,12-dimetilbenz-[a]-anthracene, meningkatkan perkembangan plak aterosklerotik di aorta ayam.<sup>25</sup>

### **4. RADIKAL BEBAS PADA ASAP ROKOK**

Asap rokok mengandung  $10^{14}$  molekul radikal bebas dalam setiap hisapnya, serta mengandung hydroquinone, kuinon, akrolein, asetaldehid dan formalin yang memicu radikal bebas ataupun melemahkan antioksidan yang ada di dalam tubuh.<sup>46</sup>

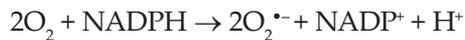
Radikal bebas dalam asap rokok dapat dikelompokkan menjadi dua kategori yaitu:

1. Radikal bebas yang terbentuk selama pembakaran tembakau dan proses merokok, contohnya; konstituen TPM dan fase gas.
2. Radikal bebas yang awalnya tidak ada dalam asap, tetapi dihasilkan oleh konstituen fase gas atau TPM yang teroksidasi dalam aerosol asap atau ketika larut dalam larutan oksigen cair atau media biologis, contohnya adalah radikal semikuinon, ROS, dan RNS.<sup>43</sup>

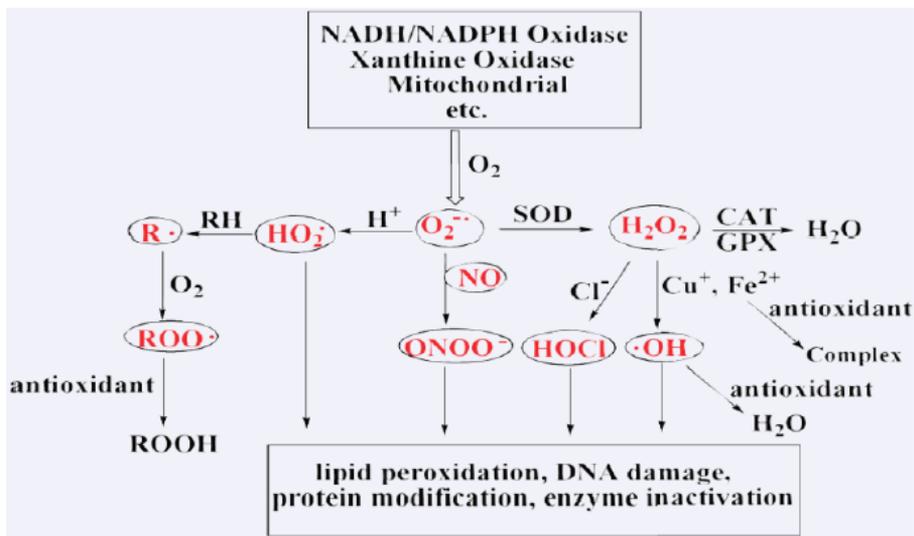
Sumber utama dari ROS dalam pembuluh darah adalah  $O_2^-$ , sedangkan sumber  $O_2^-$  yang paling penting adalah terdiri dari NADPH oksidase, xantin oksidase, *Mitochondrial Electron Transporter Chain* (METC), dan eNOS.<sup>10,27</sup> Merokok meningkatkan produksi  $O_2^-$  pembuluh darah yang mengakibatkan ketersediaan hayati NO dan produksi prostasiklin menurun.

Enzim NADPH oksidase dalam pembuluh darah bertanggung jawab untuk produksi  $O_2^-$  saat terpapar ekstrak asap rokok.<sup>27</sup> Enzim NADPH oksidase terdiri dari lima isoform yaitu NOX 1-5. Peningkatan ekspresi NADPH oksidase subunit gp91phox dan NOX-4 pada arteri aterosklerotik, berkontribusi pada peningkatan stres oksidatif dalam pembuluh darah.<sup>10,27</sup>

Komponen asap rokok yang dikenali dapat mengaktivasi NADPH oksidase adalah benzopiren dan akrolein, sedangkan yang lain belum teridentifikasi karena banyaknya zat yang terkandung dalam asap rokok.<sup>27</sup> Barbieri *et al.* menunjukkan bahwa serum dari perokok aktif menginduksi produksi ROS dengan peningkatan ekspresi NADPH oksidase dan COX-2 melalui aktivasi jalur p38 *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK) di sel endotel.<sup>27</sup> Berikut adalah reaksi kimia proses pembentukan  $O_2^-$  melalui NADPH oksidase:



Sumber lain  $O_2^-$  pembuluh darah adalah enzim *xanthine oxidoreductase*. *Xanthine oxidoreductase* terlibat dalam degradasi purin dan mengkatalisis oksidasi *hypoxanthine* ke *xanthine*, dan selanjutnya dari *xanthine* ke asam urat.<sup>7,10,21</sup> *Xanthine oxidoreductase* dalam bentuk dehidrogenase bisa berubah ke bentuk oksidase pada kondisi inflamasi. *Xanthine dehydrogenase* mengkatalisis reduksi  $NAD^+$  (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide*) menjadi NADH, sedangkan *xanthine oxidase* mengkatalisis reduksi oksigen molekuler menjadi  $O_2^-$  dan  $H_2O_2$ . ROS yang diinduksi oleh *xanthine oxidase* adalah sumber stres oksidatif karena asap rokok ataupun karena kondisi iskemia ataupun reperfusi.<sup>10, 21</sup>



**GAMBAR 6.** Ringkasan jenis dan mekanisme pembentukan ROS dan titik aksi enzim antioksidan (dimodifikasi dari Mudau M).<sup>18</sup>

Sitokin inflamasi meningkatkan pembentukan ROS melalui NADPH oksidase ataupun *xanthine oxidase*. Gao *et al.* melaporkan bahwa TNF- $\alpha$  menginduksi disfungsi endotel melalui peningkatan aktivitas NADPH oksidase pada arteriol koroner tikus dengan diabetes tipe 2. Zhang *et al.*, menunjukkan hal yang berbeda, yaitu disfungsi endotel pada cedera iskemia-reperfusion miokard disebabkan karena peningkatan ekspresi TNF- $\alpha$  melalui peningkatan aktivitas *xanthine oxidase*.<sup>18</sup>

Molekul oksigen sangat penting untuk pembentukan energi dalam mitokondria, yang dikenal dengan proses fosforilasi oksidatif dengan hasil akhir seperti ATP, H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>, dan sejumlah kecil ROS. Produksi ROS yang berlebihan akan bersifat toksik.<sup>21</sup> Superoksida mitokondria merupakan sumber utama ROS intraseluler dalam kondisi fisiologis. Kadar O<sub>2</sub><sup>•-</sup> mitokondria diatur oleh pernapasan dan aktivitas SOD yang terletak di matriks organel. Stimulasi sel endotel oleh angiotensin II, Ox-LDL, peroksidasi lipid, kadar glukosa tinggi, asam lemak bebas, protein

kinase C, dan *strain* siklik mampu menstimulasi produksi O<sub>2</sub><sup>-</sup> mitokondria dan meningkatkan produksi ROS mitokondria.<sup>10</sup>

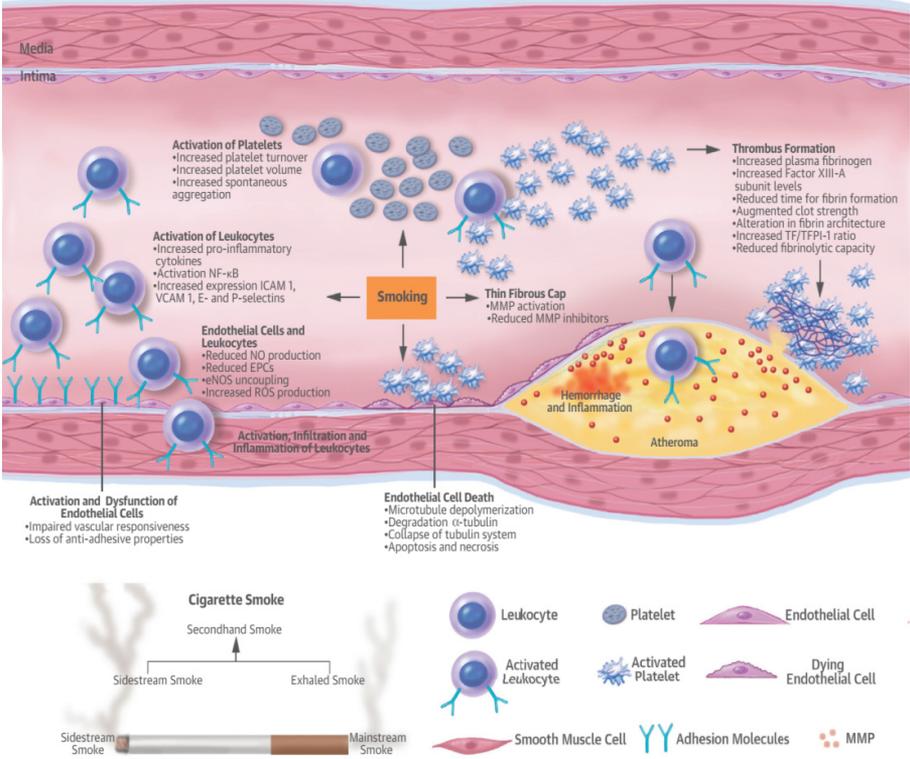
## 5. EFEK AKUT PAPARAN ASAP ROKOK TERHADAP PEMBULUH DARAH

Merokok adalah faktor risiko paling penting yang dapat dimodifikasi untuk mengembangkan aterosklerosis termasuk kecelakaan serebrovaskular, penyakit arteri perifer, dan penyakit jantung koroner. Dalam metaanalisis dari 55 studi yang memenuhi syarat (43 studi *cross-sectional*, sepuluh kohort, dan dua studi kasus-kontrol), odds ratio (OR) penyakit arteri perifer (PAD) yang terkait dengan paparan rokok adalah 2,71 (95% CI: 2,28-3,21; p <0,001). Dalam metaanalisis dari 75 kohort (2,4 juta peserta) yang disesuaikan untuk faktor risiko kardiovaskular selain penyakit jantung koroner, OR gabungan yang disesuaikan untuk merokok versus tidak merokok adalah 1,25 (95% CI: 1,12-1,39, p <0,0001).<sup>47</sup>

Meskipun studi epidemiologi dengan jelas menyatakan efek negatif dari asap rokok untuk penyakit kardiovaskular, mekanisme yang mendasarinya belum dikonfirmasi. Patogenesis dan mekanisme patofisiologi saat paparan asap rokok dapat mempercepat aterosklerosis penyakit kardiovaskular sangat kompleks dan menantang, karena lebih dari 5.000 campuran bahan kimia yang berbeda di dalam asap rokok itu sendiri.<sup>4</sup> Beberapa faktor potensial yang berkontribusi terhadap aterogenesis di dalam asap rokok adalah, (1) hidrokarbon aromatik polisiklik, (2) zat pengoksidasi, (3) partikel, dan (4) nikotin.

Salah satu faktor terpenting yang berkontribusi terhadap proaterogenik adalah nikotin, yang telah umum dipelajari dengan menggunakan kondensat asap rokok. Selain perannya sebagai agen pembiasa dalam tembakau, nikotin juga mempercepat aterosklerosis. Ada beberapa mekanisme potensial dari efek proaterogenik nikotin: (1) menginduksi disfungsi endotel, (2) memodifikasi profil lipid, (3) meningkatkan respons inflamasi, (4) menginduksi pelepasan katekolamin, yang dapat meningkatkan denyut jantung dan tekanan darah, (5) meningkatkan agregasi trombosit, (6) aksi langsung pada elemen seluler yang

berpartisipasi dalam pembentukan plak, dan (7) menginduksi proliferasi dan migrasi sel otot polos vaskular ke dalam intima, yang sebagian dimediasi oleh  $TGF\beta^{47}$ . Ini patomekanisme nikotin dapat menyebabkan peningkatan ketebalan media intima dari seluruh pembuluh darah, yang mengarah pada risiko lebih besar berkembangnya aterosklerosis.



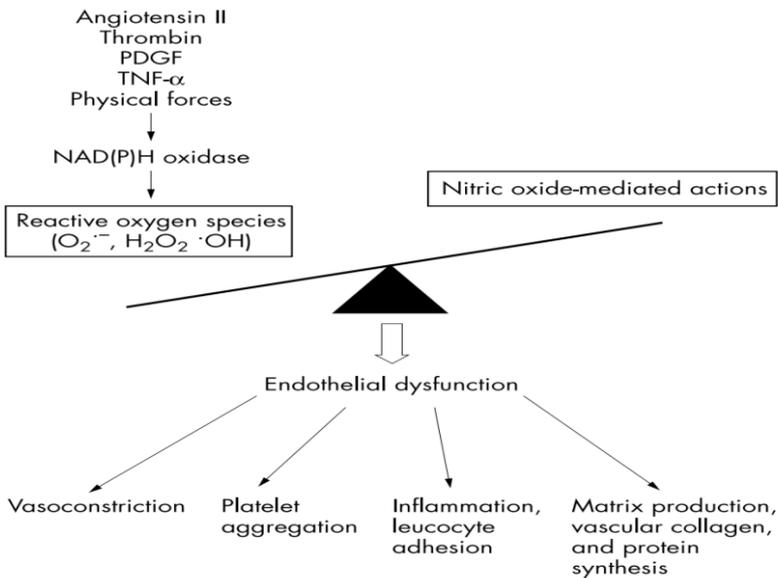
**GAMBAR 7.** Pengaruh kandungan asap rokok terhadap proses aterosklerosis (Csordas dan Bernhard, 2013).

Untuk mempelajari lebih lanjut tentang patomekanisme endotelium yang disfungsional, kita perlu mempelajari semua molekul pengoksidasi, inflamasi, dan trombotik yang tidak berada dalam keadaan setimbang. Dalam model penyakit kardiovaskular aterosklerosis, telah diamati ketidakseimbangan patologis antara keadaan protrombotik dan

antitrombotik, keadaan prooksidan dan antioksidan, dan keadaan proinflamasi dan antiinflamasi. Banyak bukti yang mendukung pentingnya peradangan dan hiperkoagulabilitas untuk meningkatkan keadaan aterogenik. Saat ini, cukup banyak literatur tentang peran biomarker ketidakseimbangan patologis pada aterosklerosis.

Molekul adhesi sel adalah protein proinflamasi dan proaterogenik esensial yang mewakili ciri disfungsi endotel dan aterosklerosis. P-selectin, *Vascular Cell Adhesion Molecule (VCAM)-1*, *Intercellular Adhesion Molecule (ICAM)-1*, dan PECAM-1 terbukti terlibat dalam pembentukan plak aterosklerosis. Di luar molekul adhesi sel lainnya, VCAM-1 berperan sebagai faktor penting dalam proliferasi neointima setelah cedera arteri yang diinduksi nikotin, area penelitian yang penting untuk penyakit kardiovaskular aterosklerosis. Dalam model cedera arteri yang diinduksi nikotin, ekspresi VCAM-1 sangat diinduksi dalam proliferasi dan migrasi jaringan halus neointima sel otot halus.

Jumlah total rokok yang diisap per hari memainkan peran penting dalam meningkatkan tingkat stres oksidatif dan penurunan fungsional sistem antioksidan. Asap rokok mengandung spesies oksigen reaktif dalam konsentrasi tinggi serta sejumlah partikel-partikel toksik berdimensi kecil yang mudah terhirup dalam tubuh manusia. Merokok menyebabkan peningkatan stres oksidatif melalui beberapa mekanisme, salah satunya yaitu dengan cara menyebabkan kerusakan langsung oleh spesies radikal dan respons inflamasi yang disebabkan oleh paparan asap rokok. Produksi stres oksidatif dan spesies oksigen reaktif akibat asap rokok telah terbukti dapat meningkatkan ekspresi VCAM-1 dan menurunkan kadar e-NOS. Menurut penelitian sebelumnya oleh Yang *et al.* (2014), peningkatan ekspresi VCAM-1 pada arteri tikus setelah terpapar asap rokok telah diamati selama tujuh hari. Penelitian translasional oleh Teasdale, dkk. (2014) dan Pott, dkk. (2017) juga mendukung temuan bahwa peningkatan stres oksidatif, spesies oksigen reaktif, dan ekspresi VCAM-1 dalam kultur sel endotel mengikuti paparan asap rokok.<sup>47</sup>



**GAMBAR 8.** Penyebab disfungsi endotel adalah adanya ketidakseimbangan Stres Oksidatif dan Aktivitas Oksida Nitrat.<sup>7</sup>

Radikal bebas biasanya tidak stabil dan sangat reaktif karena elektron yang tidak berpasangan dan cenderung membentuk pasangan dengan elektron lain. Metabolit oksigen reaktif dihasilkan oleh eksitasi elektron sekunder untuk menambah energi atau interaksi dengan unsur-unsur transisi. Seperti yang tampak pada Gambar 8, metabolit oksigen reaktif yang dihasilkan lebih reaktif daripada molekul oksigen asli dan disebut *Reactive Oxygen Species* (ROS), seperti anion superoksida ( $O_2^-$ ), hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), radikal hidroksil ( $\cdot OH$ ), dan singlet oksigen ( $O_2$ ).

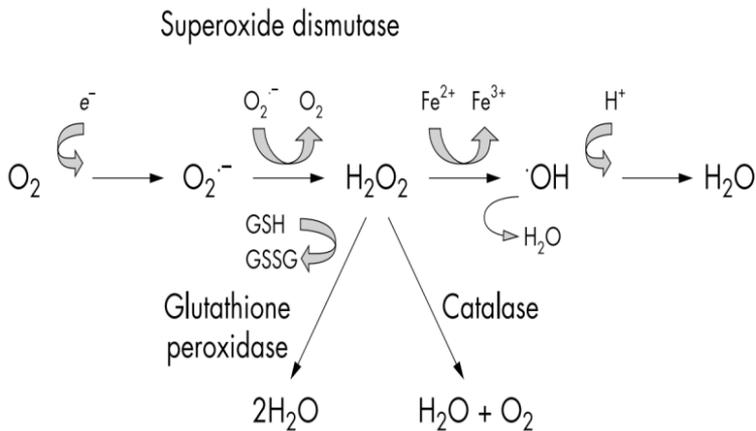
*Reactive Oxygen Species* secara fisiologis sebagai produk sampingan dari metabolisme sel, atau sebagai molekul toksik yang terlibat dalam pembunuhan bakteri dan pertahanan *host*. Radikal bebas secara alami dapat terbentuk dalam berbagai sistem biologis dan kimia yang menyebabkan kerusakan pada sistem biologis dan sel.

*Reactive Oxygen Species* dapat berinteraksi dengan protein, lipid, dan *Deoxyribonucleic Acid* (DNA). Produksi ROS yang berlebihan menyebabkan

patogenesis berbagai penyakit termasuk penuaan, cedera reperfusi, demensia, dan aterosklerosis.

Ketika produksi ROS melebihi kapasitas *buffer* sistem pertahanan antioksidan atau ketika enzim antioksidan rusak maka terjadi stres oksidatif. Faktor risiko kardiovaskular dan stres oksidatif memengaruhi pertahanan dari endotel dan menyebabkan disfungsi endotel, proliferasi dan migrasi VSMCs serta adhesi dan migrasi leukosit.

*Nitric Oxide* juga dapat dikonversi menjadi turunan yang lebih reaktif, sebagai *Reactive Nitrogen Species* (RNS), seperti *nitrogen dioxide* ( $\text{NO}_2$ ), *dinitrogen trioxide* ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), *nitrogen tetroxide* ( $\text{N}_2\text{O}_4$ ) dan peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) (Wooten *et al.*, 2006). Pembentukan peroksinitrit yang berlebihan menginduksi protein (seperti; hemoglobin, *myeloperoxidase* (MPO), *glutathione peroxidase*, dan lain-lain), disfungsi mitokondria, disfungsi endotel dan apoptosis. Karena peroksinitrit berumur pendek dan sulit diukur secara langsung, maka yang dapat diukur adalah *3-nitrotyrosine* yang merupakan produk nitrosasi tirosin oleh peroksinitrit secara *in vivo*.



**GAMBAR 9.** Generasi Spesies Oksigen Reaktif. Molekul oksigen ( $\text{O}_2$ ) bereaksi dengan elektron ( $e^-$ ) membentuk anion superoksida ( $\text{O}_2^-$ ). Anion superoksida diubah menjadi hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) oleh enzim superoksida dismutase. Hidrogen peroksida mengalami konversi spontan menjadi radikal hidroksil yang sangat reaktif ( $\cdot\text{OH}$ ) Atau, dapat didetoksifikasi melalui glutathione peroxidase atau *catalase* ke air ( $\text{H}_2\text{O}$ ) dan oksigen.<sup>7</sup>

VCAM-1 diekspresikan dalam sel endotel vaskular dan dapat meningkatkan adhesi leukosit ke sel endotel. VCAM-1 mempercepat migrasi leukosit yang menempel di sepanjang permukaan endotel, dan mendorong proliferasi sel otot polos pembuluh darah. Dengan demikian, VCAM-1 memainkan peran penting sebagai molekul proaterogenik. Paparan asap rokok dapat meningkatkan ekspresi VCAM-1 di aorta meskipun peningkatannya tidak signifikan secara statistik. Peningkatan yang tidak signifikan dalam ekspresi VCAM-1 juga ditemukan dalam penelitian bersubjek manusia yang diadakan oleh Noguchi (1999). Pada penelitian sebelumnya, kadar VCAM-1 terlarut meningkat pada serum perokok tetapi tidak signifikan jika dibandingkan dengan serum bukan perokok.<sup>47</sup>

Peningkatan ekspresi VCAM-1 merupakan proses multifaktorial, merokok tidak dapat meningkatkan VCAM-1 secara mandiri tanpa faktor risiko lain seperti dislipidemia. Mu, dkk. (2015) telah membuktikan hipotesis ini dengan memeriksa ekspresi VCAM-1 pada jaringan aorta pasien dislipidemia. Akibatnya, ekspresi VCAM-1 berkorelasi positif dengan kadar trigliserida, kolesterol total dan LDL sedangkan VCAM-1 dan HDL berkorelasi negatif karena ekspresi VCAM-1 dalam sel endotel memerlukan pemicu yaitu kadar lipid yang tinggi, terutama LDL. Peningkatan LDL teroksidasi di endotel akan difagositosis oleh makrofag.

Penurunan bioavailabilitas NO adalah mekanisme sentral dalam patofisiologi disfungsi endotel. e-NOS merupakan enzim yang bertanggung jawab untuk memproduksi NO pada sel endotel, sehingga kadar eNOS dapat merepresentasikan ketersediaan NO pada sel endotel. Disfungsi sel endotel sendiri dapat diuji dengan fungsi respons asetilkolin dan tes cadangan aliran koroner adenosin. Celermajer *et al.* (1992) menerbitkan sebuah penelitian yang menunjukkan bahwa merokok mengurangi dilatasi yang dimediasi aliran (FMD) di arteri sistemik pada dewasa muda yang sehat.<sup>47</sup>

Studi sebelumnya menunjukkan bahwa paparan asap rokok dapat menurunkan kadar eNOS di aorta. Penurunan eNOS ini tak hanya meningkatkan ekspresi molekul adhesi namun juga menginisiasi

inflamasi dan koagulasi, yang nantinya akan menjadi tahap awal dari arterosklerosis.<sup>47</sup> Hasil ini konsisten dengan temuan He *et al.* (2017), yang menunjukkan penurunan signifikan kadar eNOS pada kultur sel endotel yang terpapar asap rokok. He *et al.* (2017) menunjukkan bahwa paparan asap rokok pada kultur sel endotel dapat menurunkan ekspresi gen dan protein eNOS, sehingga mengakibatkan disfungsi sel endotel. Di sisi lain, Su *et al.* (1998) telah membuktikan bahwa pemberian ekstrak asap rokok dapat menurunkan ekspresi gen dan protein eNOS. Efek pengurangan eNOS tergantung pada durasi paparan sel. Semakin lama durasi paparan asap rokok maka kadar eNOS akan semakin menurun.<sup>30</sup> Selain penurunan eNOS pada level gen, Pini *et al.* (2016) menunjukkan bahwa paparan asap rokok juga terbukti menurunkan eNOS pada level protein. Kadar eNOS menurun pada aorta marmut setelah terpapar rokok selama delapan minggu.

Telah ditunjukkan bahwa merokok memicu demetilasi, yang mengarah ke reaktivasi berturut-turut dari gen yang dibungkam secara epigenetik *in vitro* dan *in vivo* dari produksi eNOS dan NO. Peroksinitrit, spesies oksigen yang sangat reaktif dan sifat prooksidan dari ekstrak rokok, diyakini mempromosikan demetilasi dan inaktivasi e-NOS.<sup>33</sup> Selain itu, peroksinitrit dan radikal bebas lainnya dapat menonaktifkan BH4 yang merupakan kofaktor penting dalam produksi eNOS. Hal ini dijelaskan oleh penelitian Abdelghany *et al.* (2018) yang menunjukkan bahwa paparan asap rokok terbukti menurunkan kofaktor BH4 dan berkorelasi dengan jumlah produksi superoksida dan NO pada kultur sel endotel.<sup>34</sup> Penurunan e-NOS dan kadar NO akan meningkatkan tonus vaskular, meningkatkan ekspresi molekul adhesi, dan memicu kaskade koagulasi dan inflamasi. Pada jalur terakhir, merokok menyebabkan peningkatan ketebalan intima-medial aorta sebagai tanda awal aterosklerosis

Berdasarkan literatur, paparan asap rokok selama 28 hari setiap hari dapat merupakan faktor risiko independen untuk proses aterosklerosis melalui beberapa mekanisme. IMT aorta pada penelitian ini meningkat pada kelompok kontrol seperti yang juga ditemukan pada penelitian yang dilakukan oleh Ali *et al.* (2012). Peningkatan IMT aorta dan seluruh pembuluh darah disebabkan oleh kondisi patologis seperti apoptosis

dan proliferasi yang berlebihan sebagai mekanisme kompensasi.<sup>37</sup> Pada penelitian sebelumnya, peningkatan IMT sebagai komplikasi disfungsi endotel mengarah pada proses aterosklerosis.<sup>38</sup> Paparan asap rokok mendasari disfungsi endotel dengan penurunan kadar e-NOS dan peningkatan ekspresi VCAM-1.

Paparan asap rokok juga memengaruhi struktur histologi aorta. Dalam penelitian ini, kami tidak hanya menemukan peningkatan IMT, tetapi juga perubahan struktural yang ditandai dengan disorganisasi dan vakuolisasi sel otot polos di tunika media jaringan aorta. Sebaliknya, tidak ada perubahan yang diamati pada tingkat tunika intima. Paparan asap rokok selama 28 hari pada penelitian Ali *et al.* (2012) juga menemukan hasil yang sama: tidak ada perubahan tunika intima yang diamati dari tikus percobaan.<sup>36</sup> Studi eksperimental lain dari Jaldin *et al.* (2013) menemukan bahwa paparan merokok selama delapan minggu hanya mengakibatkan disorganisasi sel otot polos pembuluh darah di tunika media.<sup>40</sup> Vakuolisasi adalah salah satu komplikasi dari proses sitotoksik dalam sel dan penanda awal aterosklerosis praklinis. Komponen kimia dari asap rokok dapat menyebabkan stres oksidatif yang ditandai dengan vakuolisasi permanen dalam sel. Pada fenotip mikroskopis, vakuolisasi membuat sel otot polos pembuluh darah memiliki bentuk dan ukuran yang berbeda-beda, sehingga mengakibatkan sel menjadi tidak teratur dan menyebabkan aterosklerosis.<sup>47</sup>

Penelitian yang telah ada menunjukkan bahwa merokok memengaruhi fungsi endotel dan meningkatkan risiko aterosklerosis. Merokok sebagai faktor risiko aterosklerosis berhubungan erat dengan peningkatan proses inflamasi pada endotel vaskular. Tingkat e-NOS yang rendah dan tingkat VCAM-1 yang tinggi yang diamati setelah paparan asap dapat meningkatkan IMT aorta. Selain itu, merokok juga ditemukan memengaruhi IMT aorta. IMT aorta sendiri mencerminkan tingkat faktor risiko CVD yang mapan pada pria dan wanita yang tampaknya sehat, menambah bukti bahwa merokok berkontribusi terhadap CVD melalui efek inflamasi pada endotel vaskular.<sup>47</sup>

## 6. EFEK MEROKOK PADA PENYAKIT KARDIOVASKULAR

Merokok, baik aktif maupun pasif, meningkatkan kejadian aterosklerosis, dari disfungsi endotel hingga berbagai jenis penyakit kardiovaskular. Lebih dari 7.000 bahan kimia, termasuk nikotin, tar, dan karbon monoksida, berkontribusi pada perkembangan penyakit kardiovaskular melalui peningkatan denyut jantung dan kontraktilitas miokard, peradangan, kerusakan endotel, pembentukan trombus, dan penurunan kadar serum kolesterol lipoprotein dengan densitas tinggi.

Disfungsi endotel dianggap sebagai langkah pertama dalam penyakit vaskular. Komponen asap rokok memicu cedera dan disfungsi endotel jauh sebelum kejadian klinis. Endotelium yang sehat menghasilkan zat vasodilatasi, termasuk nitric oxide (NO), prostasiklin, dan faktor hiperpolarisasi yang diturunkan dari endotel. Ketika endotel mengalami cedera, sintesis dan bioaktivitas vasodilator ini terganggu, dan keseimbangan antara vasodilator dan vasokonstriktor menjadi rusak. Saat ini, stres oksidatif dan peningkatan regulasi sitokin inflamasi, yang keduanya disebabkan oleh spesies oksigen reaktif dalam rokok, asap, dianggap memainkan peran penting dalam disfungsi endotel dengan mengurangi bioavailabilitas NO. Secara khusus, anion superoksida mengurangi ketersediaan NO melalui pembentukan peroksinitrit, yang juga menyebabkan oksidasi lipoprotein densitas rendah. Sitokin inflamasi meningkatkan proses perubahan aterosklerotik, yang menyebabkan disfungsi endotel. Selain itu, paparan asap rokok menyebabkan aktivasi trombosit, stimulasi kaskade koagulasi, dan gangguan fibrinolisis antikoagulasi. Efek ini mengarah pada pembentukan penyakit pembuluh darah.

Endotelium normal memainkan peran penting dalam regulasi perubahan tonus vaskular. Ketika endotelium terganggu, sel-sel endotel yang rusak harus diangkat dan diganti untuk mempertahankan tonus vaskular. Sejumlah penelitian telah mengungkapkan bahwa kapasitas perbaikan endotel berkurang pada perokok dibandingkan dengan bukan perokok. Secara khusus, perokok memiliki yang bersirkulasi lebih sedikit dan gangguan vasodilatasi yang bergantung pada endotel. Salah satu mekanisme ketika dinding pembuluh darah yang cedera

menjalani perbaikan adalah melalui perekrutan EPC yang bersirkulasi. Merokok meningkatkan tingkat stres oksidatif dan mengurangi aktivitas NO, mengganggu mobilisasi EPC dan menurunkan waktu paruhnya. Temuan lain juga mendukung hubungan antara merokok dan disfungsi endotel dalam hal EPC. Misalnya, berhenti merokok dikaitkan dengan peningkatan jumlah EPC yang bersirkulasi dan peningkatan vasodilatasi yang bergantung pada endotel.

Karena nikotin menyebabkan peningkatan jangka pendek dalam pengeluaran energi, perokok cenderung memiliki berat badan yang lebih ringan daripada bukan perokok pada awalnya. Namun, seiring waktu, merokok meningkatkan resistensi insulin dan dikaitkan dengan akumulasi lemak sentral, yang mengarah pada perkembangan sindrom metabolik dan diabetes mellitus (DM). Dalam sebuah Kohort di Jepang, subjek yang terdeteksi pada tahap awal, berada pada peningkatan risiko penyakit kardiovaskular.

Merokok dapat berdampak pada peningkatan tekanan darah. Efek merokok pada tekanan darah sangat kompleks. Merokok hanya dengan 1 batang rokok meningkatkan tekanan darah secara akut dan sementara melalui aktivasi saraf simpatis. Dalam 1 penelitian, rata-rata peningkatan sementara tekanan darah sistolik setelah rokok pertama adalah sekitar 20 mmHg. Waktu paruh nikotin setelah merokok adalah sekitar 2 jam. Oleh karena itu, ketika merokok terus berlanjut, tekanan darah tetap tinggi.

Efek kronis merokok pada tekanan darah masih kerap diperdebatkan. Namun, perokok dengan tekanan darah normal hingga tinggi-normal (120–139/75–89 mmHg) diketahui memiliki peningkatan risiko penyakit kardiovaskular dibandingkan dengan nonperokok dengan tekanan darah normal hingga tinggi-normal. Selain itu, tekanan darah rawat jalan siang hari cenderung lebih tinggi daripada pengukuran di klinik pada perokok. Oleh karena itu, praktisi medis harus waspada terhadap hipertensi bertopeng ketika mereka merawat perokok dengan tekanan darah normal hingga tinggi-normal. Selain itu, merokok meningkatkan kekakuan arteri yang bertahan selama satu dekade setelah berhenti merokok; kekakuan arteri yang persisten ini juga terkait dengan peningkatan risiko kejadian penyakit kardiovaskular.

Paparan asap tembakau meningkatkan risiko ruptur plak koroner, sehingga mendorong pembentukan trombus pada lesi dan menyebabkan timbulnya sindrom koroner akut (ACS), termasuk kematian jantung mendadak. Selain itu, merokok tembakau menimbulkan spasme arteri koroner dengan atau tanpa penyempitan koroner yang signifikan. Dibandingkan dengan orang Kaukasia, pasien Jepang menunjukkan insiden spasme koroner dan vasokonstriksi yang lebih besar. Risiko spasme koroner yang disebabkan oleh merokok menunjukkan beberapa kecenderungan genetik pada orang Asia Timur.

Merokok merupakan faktor risiko potensial untuk stroke pada pria dan wanita. Sebuah metaanalisis dari 32 penelitian mengungkapkan bahwa merokok meningkatkan risiko pengembangan aneurisma serebral dan perdarahan subarachnoid (risiko relatif, 2,93; interval kepercayaan 95%, 2,48 -3,46) dan infark serebral (risiko relatif, 1,92; interval kepercayaan 95%, 1,71-2,16).<sup>47</sup> Pecahnya plak koroner mendadak akibat rokok dan aneurisme serebral awitan tiba-tiba bersama-sama menyebabkan peningkatan kematian mendadak intrinsik di antara perokok.

Jumlah rokok yang diisap setiap hari menunjukkan hubungan dosis-respons dengan risiko penyakit kardiovaskular, tetapi hubungan tersebut tidak linier untuk penyakit jantung koroner yang risikonya meningkat setelah terpapar bahkan pada tingkat asap yang rendah. Akibatnya, tidak ada tingkat merokok yang aman dalam hal penyakit kardiovaskular – perlu diingat bahwa merokok hanya 1 batang rokok setiap hari menyumbang setengah dari kelebihan risiko PJK yang disebabkan oleh merokok 20 batang sehari. Terjadinya vasospasme, atau hubungan nonlinear antara jumlah partikulat halus dalam asap rokok dan efeknya yang nyata pada agregasi trombosit, dapat menjelaskan risiko tinggi terkait untuk penyakit kardiovaskular.

Asap rokok sekunder atau *second hand smoke*, yaitu asap rokok yang memenuhi restoran, kantor, dan ruang tertutup lainnya ketika orang membakar produk tembakau, juga dapat meningkatkan risiko penyakit jantung koroner. Nonperokok yang terpapar asap rokok memiliki peningkatan risiko morbiditas dan mortalitas penyakit kardiovaskular. Sebuah metaanalisis telah menunjukkan 25-30% peningkatan risiko PJK

yang disebabkan oleh paparan asap rokok. Tidak ada tingkat yang aman dari paparan asap tembakau dan undang-undang bebas asap rokok di Jepang telah mengurangi kejadian SKA. Secara khusus, insiden SKA menurun 15% setelah merokok tembakau dilarang secara hukum dari semua tempat umum, termasuk bar. Daerah yang memiliki pembatasan sebagian merokok atau penerapan larangan merokok yang rendah tidak menunjukkan penurunan SKA yang terkait dengan larangan menyeluruh.

## **7. ANEURISMA AORTA ABDOMINAL (AAA) DAN PENYAKIT ARTERI PERIFER**

Merokok merupakan faktor risiko yang kuat untuk AAA. Metaanalisis mengungkapkan bahwa risiko AAA sekitar 5 kali lipat lebih besar pada perokok saat ini dan 2 kali lipat lebih besar pada mantan perokok dibandingkan dengan bukan perokok. Selain itu, hubungan dosis-respons positif muncul antara jumlah rokok yang diisap setiap hari dan risiko AAA. Dalam studi Kohort berbasis komunitas, 1 dari 9 perokok paruh baya saat ini mengembangkan AAA klinis atau asimtomatik dalam hidup mereka, dan berhenti merokok mengurangi risiko seumur hidup sebesar 29%. Oleh karena itu, ultrasonografi satu kali untuk menyaring AAA direkomendasikan untuk perokok pria dan mantan perokok.

Penyakit arteri perifer yang berhubungan dengan merokok termasuk arteriosklerosis obliterans (ASO) dan penyakit Buerger (tromboangiitis obliterans). ASO adalah penyakit arteri oklusif yang memengaruhi aorta perut dan arteri kecil dan menengah pada ekstremitas bawah. ASO sekitar 3 kali lipat lebih umum di antara perokok daripada bukan perokok, dan hubungan antara merokok dan ASO mungkin lebih kuat daripada antara merokok dan penyakit jantung koroner. Tingkat keparahan ASO cenderung meningkat dengan jumlah rokok yang diisap.

Penyakit Buerger adalah penyakit langka pada arteri dan vena di lengan dan kaki. Hubungan yang kuat antara penyakit Buerger dan merokok tidak dapat dilebih-lebihkan; kebanyakan pasien dengan penyakit Buerger adalah perokok berat. Pasien dengan penyakit Buerger

harus berhenti merokok sepenuhnya, karena berhenti merokok adalah pengobatan yang paling efektif.<sup>57</sup> Salah satu mekanisme yang mendasari penyakit Buerger mungkin melibatkan gangguan sirkulasi EPC, dan transplantasi EPC autologus adalah strategi efektif untuk pasien tanpa pilihan dengan iskemia ekstremitas kritis yang disebabkan oleh penyakit Buerger.

## **8. REHOSPITALISASI PASIEN DENGAN GAGAL JANTUNG**

Menghindari rehospitalisasi untuk gagal jantung adalah penting dalam hal prognosis, kualitas hidup, dan biaya pengobatan. Berhenti merokok adalah kuncinya cara untuk menghindari gagal jantung, karena merokok saat ini merupakan faktor risiko yang signifikan untuk kematian dan rawat inap untuk insiden gagal jantung.

Merokok saat ini menimbulkan vasokonstriksi dan meningkatkan tekanan darah dan denyut jantung melalui efek nikotin pada aktivasi saraf simpatik. Peningkatan kadar karbon monoksida pada perokok saat ini menyebabkan iskemia kronis di jantung dan organ lain dengan menghambat kemampuan hemoglobin untuk membawa oksigen, sehingga semakin memperburuk HF. Selain itu, peningkatan kadar sitokin inflamasi, disfungsi endotel, dan gangguan fungsi ginjal berkontribusi pada tingginya tingkat penerimaan kembali gagal jantung di antara perokok saat ini.

## **9. FIBRILASI ATRIAL**

Hubungan antara merokok dan perkembangan fibrilasi atrial tidak konsisten pada populasi Jepang. Dalam kohort kedua dari Studi Hisayama, yang dimulai pada tahun 1974, merokok tidak dikaitkan dengan perkembangan fibrilasi atrial pada pria atau wanita. Namun, dalam penelitian terbaru, merokok saat ini secara independen terkait dengan fibrilasi atrial pada pria dan wanita Jepang, serta populasi etnis lainnya.

Merokok tembakau meningkatkan perkembangan fibrilasi atrial dalam beberapa cara. Nikotin dalam asap rokok merangsang transmisi

saraf simpatik dan dapat meningkatkan kerentanan terhadap fibrilasi atrial. Selain itu, nikotin berkontribusi pada perkembangan fibrosis atrium, yang mendukung terjadinya aritmia atrium. Lebih lanjut, merokok dapat secara tidak langsung menjadi predisposisi fibrilasi atrial melalui efek pada penyakit jantung iskemik dan perubahan hemodinamik.

Risiko stroke dan tromboemboli tinggi pada orang dengan fibrilasi atrial. Skor CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc berguna untuk mengidentifikasi risiko stroke pada orang yang terkena, dan terapi antikoagulan biasanya dimulai ketika skor CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc adalah 2. Mengingat bahwa sebagian besar perokok juga memiliki penyakit pembuluh darah, skor CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc pasti lebih tinggi pada perokok daripada bukan perokok. Akibatnya, perokok dengan fibrilasi atrial berada pada risiko tinggi untuk stroke tromboemboli.

## 10. TROMBOEMBOLI VENA

Tromboemboli vena, termasuk trombosis vena dalam dan emboli paru, merupakan penyebab morbiditas dan mortalitas yang cukup besar di seluruh dunia. Hubungan antara merokok tembakau dan tromboemboli vena agak tidak jelas karena persaingan risiko untuk kanker dan infark miokard. Pada perokok berat, tromboemboli vena kemungkinan akan terjadi setelah perkembangan kanker atau infark miokard, sehingga memperumit penilaian efek terisolasi merokok pada tromboemboli vena. Dalam analisis lebih dari 1,1 juta peserta di 76 kohort, merokok jelas dikaitkan dengan peningkatan risiko tromboemboli vena.

## 11. PERUBAHAN KESEHATAN YANG MENGUNTUNGKAN DARI BERHENTI MEROKOK

Berhenti merokok meningkatkan vasodilatasi yang bergantung pada endotel dan mengurangi risiko morbiditas dan mortalitas penyakit kardiovaskular. Beberapa perubahan yang menguntungkan terjadi setelah berhenti merokok. Secara khusus, tekanan darah menurun dalam 20 menit, dan dalam 2–12 minggu jumlah dan fungsi *rebound* EPC yang bersirkulasi

dan vasodilatasi yang bergantung pada endotel meningkat. Selain itu, risiko PJK dan risiko kematian pada 1 tahun setelah berhenti adalah sekitar setengah dari perokok saat ini; pada 5–15 tahun setelah berhenti merokok, risiko stroke berkurang dibandingkan bukan perokok.

Kami sebelumnya menunjukkan bahwa berhenti merokok selama lebih dari 4 tahun mengurangi kematian total (HR 0,57; interval kepercayaan 95%, 0,34–0,91), stroke (HR 0,52; interval kepercayaan 95%, 0,24–1,01), dan penyakit kardiovaskular (HR 0,27; interval kepercayaan 95%, 0,13–0,50) di antara pria Jepang paruh baya. Dalam studi kohort 10 tahun dari 94.683 orang Jepang (41.782 pria dan 52.901 wanita), risiko PJK dan penyakit kardiovaskular secara keseluruhan menurun dalam waktu 2 tahun setelah berhenti merokok dan risiko stroke menurun pada 2–4 tahun sesudahnya.

## **12. MEKANISME PENGARUH ASAP ROKOK TERHADAP KERUSAKAN PEMBULUH DARAH DAN GANGGUAN KARDIOVASKULAR**

Terjadinya kerusakan pembuluh darah hingga menyebabkan gangguan kardiovaskular pada perokok dapat terjadi dengan berbagai macam mekanisme, salah satunya ditentukan oleh latar belakang genetik dan dikaitkan dengan perubahan pola epigenetik. Predisposisi genetik untuk ketergantungan nikotin sekarang telah diketahui. Hingga batas tertentu, semua penyakit kardiovaskular yang berhubungan dengan merokok/tembakau mungkin melibatkan komponen genetik tertentu. Seperti halnya dengan efek candu pada substrat lain, selain faktor genetik dan epigenetik, mekanisme pengaruh asap rokok terhadap terjadinya kerusakan pembuluh darah juga bergantung dengan aktivitas antioksidan di dalam tubuh. Antioksidan didefinisikan sebagai zat yang mampu menghambat proses oksidatif dan menghambat reaksi kimia yang mentransfer elektron atau hidrogen ke agen pengoksidasi. Antioksidan menghambat produksi ROS dan radikal bebas.

## a. Genetika dan Epigenetik dari Penyakit Kardiovaskular Terkait Merokok

Faktor genetik dan epigenetik sangat penting dalam biologi dan penyakit kardiovaskular. Merokok, salah satu faktor risiko kardiovaskular yang paling penting, sebagian ditentukan oleh latar belakang genetik dan dikaitkan dengan perubahan pola epigenetik. Ini dapat menjadikan genetika dan epigenetik penyakit kardiovaskular terkait merokok sebagai contoh buku teks epigenetik lingkungan dan pendekatan modern untuk analisis data multimodal. Hubungan nyata pola metilasi terkait merokok pada gen F2RL3 dengan prognosis pada pasien dengan penyakit jantung koroner stabil baru-baru ini telah dijelaskan. Meskipun demikian, sedikit pengetahuan konkret yang mengejutkan tentang peran varian genetik spesifik dan modifikasi epigenetik dalam perkembangan penyakit kardiovaskular pada orang yang merokok telah terakumulasi. Di luar pengetahuan saat ini, tinjauan ini secara singkat menguraikan beberapa tantangan utama dan prioritas untuk bergerak maju di bidang ini.

Predisposisi genetik untuk ketergantungan nikotin sekarang telah diketahui. Hingga batas tertentu, semua penyakit kardiovaskular yang berhubungan dengan merokok/tembakau mungkin melibatkan komponen genetik tertentu. Seperti halnya dengan efek candu pada substrat lain, ketergantungan nikotin adalah fenotipe kompleks yang dihasilkan dari rantai peristiwa faktor genetik yang tampaknya lebih penting untuk perkembangan kecanduan lebih lanjut. Menariknya, salah satu studi pertama yang menyelidiki determinan genetik perilaku merokok pada skala luas genom apriori memasukkan fenotipe ganas dan kardiovaskular sebagai contoh penyakit terkait merokok: polimorfisme nukleotida tunggal dalam ketidakseimbangan hubungan dengan rs1051730 terletak pada kromosom 15 di sekitar sekelompok gen yang mengode subunit reseptor asetilkolin nikotinat (CHRNA5, CHRNA3, CHRNB4) secara signifikan terkait tidak hanya dengan ketergantungan nikotin, tetapi juga dengan kanker paru-paru dan dengan penyakit arteri perifer.

Banyak gen lain yang mengode sebagian besar reseptor neurotransmitter (misalnya, CHRNB3, GABRA4) atau enzim yang terlibat

dalam neurotransmitter atau metabolisme nikotin (misalnya, DAO, FMO1, CYP2B6) telah terlibat dalam ketergantungan nikotin melalui pendekatan gen kandidat, beberapa di antaranya menunjukkan jenis kelamin spesifik. Tambahan lokus genetik yang relevan juga telah diidentifikasi dalam analisis luas genom yang lebih luas. Hubungan 15q24-25.1 dengan merokok terus disempurnakan, dengan varian tambahan menunjukkan hubungan independen seperti halnya hubungan dengan usia saat memulai kebiasaan merokok. Aspek-aspek perilaku merokok tersebut secara masuk akal terkait dengan keparahan ketergantungan nikotin, paparan kumulatif tembakau-merokok seumur hidup, dan akhirnya risiko penyakit kardiovaskular terkait merokok. Di samping catatan, bukti terbaru menunjukkan bahwa hubungan rs1051730 dan polimorfisme terkait dengan kanker paru-paru tidak secara eksklusif karena hubungannya dengan fenotipe merokok tembakau, melainkan bertindak secara substansial melalui koneksi patofisiologi tambahan. Studi terperinci seperti itu pada rs1051730 dan arteri perifer penyakit atau fenotipe kardiovaskular lainnya masih belum banyak dipelajari.

Interaksi gen-lingkungan klasik diyakini berperan dalam penyakit kardiovaskular terkait tembakau dan telah dilaporkan untuk berbagai polimorfisme. Salah satu contoh yang dipelajari adalah interaksi merokok dengan varian apolipoprotein E. Isoform apolipoprotein  $\epsilon 4$  tidak hanya menjadi antioksidan yang lebih buruk daripada varian lainnya, tetapi juga dikaitkan dengan pergeseran distribusi lipoprotein yang mendukung produksi lipoprotein teroksidasi. Variasi genetik dalam ketahanan antioksidan ini tampaknya tidak memiliki konsekuensi kardiovaskular klinis dengan sendirinya, tetapi—dalam interaksi dengan stres oksidatif berlebihan yang disebabkan oleh merokok—ini berarti bahwa risiko kardiovaskular terkait merokok jauh lebih besar pada karier 4 daripada subjek lain. telah disadari bahwa interaksi gen-lingkungan seperti itu juga dapat mengganggu kinerja obat penurun lipid, tetapi sejauh mana masalah yang berpotensi luas ini masih perlu diklarifikasi.

Mengingat banyaknya fenomena fisiologis yang terlibat dalam penyakit kardiovaskular terkait merokok tembakau, tidak mengherankan bahwa interaksi serupa dengan merokok telah dilaporkan untuk varian

urutan dalam gen kandidat yang mengode protein yang beragam seperti lipoprotein, lipase dan mutasi protrombotik interleukin-6, seperti faktor II G20210A, atau transformasi faktor pertumbuhan- $\beta$ 1. Satu studi menyelidiki interaksi polimorfisme interleukin-18 dengan merokok mengenai risiko penyakit kardiovaskular luar biasa untuk desain kolaboratif terpuji menekankan kekuatan statistik. Meskipun demikian, tingkat bukti untuk sebagian besar interaksi merokok gen yang saat ini disarankan pada akhirnya tetap sangat terbatas. Evolusi temuan mengenai interaksi antara merokok tembakau dan varian dalam gen glutathione S-transferase sehubungan dengan risiko penyakit kardiovaskular harus dianggap sebagai pengingat akan bahaya interpretasi yang berlebihan terhadap interaksi gen-merokok atau bahkan interaksi urutan yang lebih tinggi (misalnya, gen-usia-merokok). Replikasi menyeluruh dan studi lanjut diperlukan untuk mengetahui hasil statistik yang baik dari studi-studi ini.

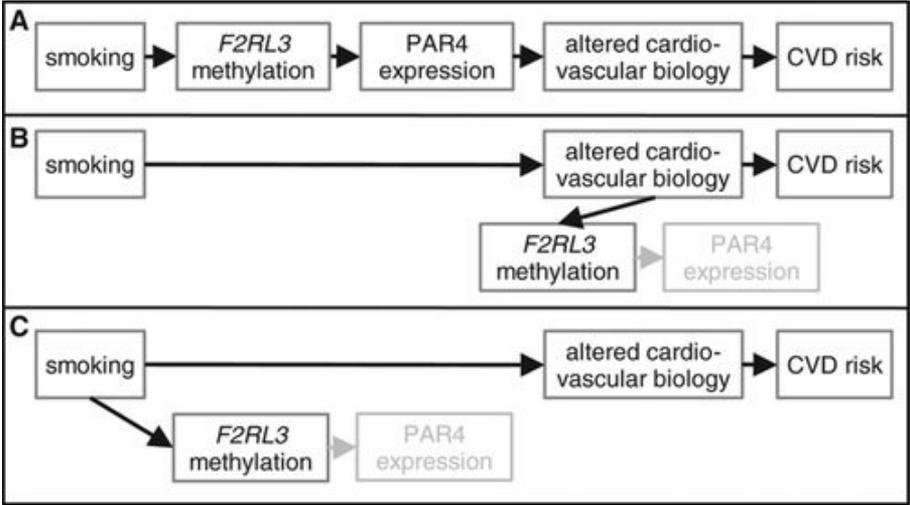
Studi tentang aspek epigenetik kesehatan dan penyakit telah marak dalam beberapa tahun terakhir, terutama karena kemajuan teknologi yang memungkinkan semakin banyak pendekatan epigenomik. Komponen paling terkenal dari epigenom ini adalah metilasi sitosin pada sitosin yang bertetangga dengan situs guanin dalam urutan DNA dan berbagai modifikasi residu histon, seperti asetilasi. RNA *non-coding* dengan sifat regulator, seperti microRNA, yang sebagian besar bertindak pada tingkat pasca-transkripsi memiliki subset yang terkait erat dengan mekanisme yang disebutkan di atas dan sehingga dianggap sebagai bagian dari sistem epigenom. Perbedaan epigenetik menghadirkan informasi tambahan yang dapat menjelaskan variasi antarindividu dalam perkembangan fenotipe penyakit. Terdapat juga interaksi yang jelas dari rangsangan lingkungan dan latar belakang. Metilasi DNA terutama ditentukan dari varian sekuensi yang disebut lokus kuantitatif metilasi, yang telah ditemukan lebih besar dari yang diperkirakan sebelumnya. Pengaruh lokus kuantitatif metilasi dapat berbeda antara jaringan, dan hal ini tampaknya menjadi fenomena yang lebih umum daripada ekspresi lokus sifat kuantitatif, yaitu varian urutan dengan efek pada tingkat ekspresi gen. Pola metilasi mengalami perubahan besar selama pengembangan dan diferensiasi jaringan.

Studi epigenomik penyakit kardiovaskular telah mendapat banyak perhatian dalam literatur terbaru, dan secara umum telah diterima bahwa regulasi epigenetik memainkan peran penting dalam biologi kardiovaskular. Berbagai macam mekanisme epigenetik terlibat dalam diferensiasi vaskular fisiologis dan patofisiologi, proliferasi, dan proses inflamasi terkait. Pentingnya metilasi DNA telah ditunjukkan untuk regulasi (dis)-sintase oksida nitrat yang dapat diinduksi, sedangkan histon spesifik modifikasi telah diidentifikasi yang terlibat dalam fiksasi pola ekspresi gen proinflamasi pada model penyakit diabetes. Fungsi trombosit juga tampaknya sangat bergantung pada pencetakan epigenetik fisiologis. Semua proses ini adalah salah satu mekanisme yang dianggap penting dalam patologi kardiovaskular terkait merokok.

Merokok, di sisi lain, telah disinyalir sebagai salah satu faktor pola epigenetik. Asosiasi perilaku merokok dengan tindakan epigenetik kasar, seperti pengganti metilasi DNA secara keseluruhan, atau dengan modifikasi pada promotor gen tertentu telah dijelaskan. Fokus tertentu dalam studi-studi ini adalah pada kandidat gen yang terlibat dalam keganasan, saat ditemukan dari sekitar 27.000 sitosin dengan *assay* guanin yang tercakup dalam penelitian, ditemukan gen yang memiliki hubungan paling signifikan secara statistik dengan perilaku merokok terletak pada lokus F2RL3, gen yang mengode *proteinase-activated receptor 4*. *Proteinase-activated receptor 4* telah diketahui terlibat dalam patofisiologi kardiovaskular, terutama pada inflamasi, fungsi trombosit, dan kemungkinan cedera miokard perioperatif setelah operasi *bypass*. Selain itu, hubungan nyata antara metilasi F2RL3 yang lebih rendah dengan kematian yang lebih tinggi (baik kardiovaskular dan nonkardiovaskular) ditunjukkan dalam kohor pasien dengan penyakit jantung koroner stabil.

Secara keseluruhan, sangat sedikit yang telah diketahui tentang pola epigenetik terkait penyakit kardiovaskular pada orang yang merokok. Bahkan metilasi F2RL3 terkait merokok adalah temuan yang kebetulan. Pekerjaan laboratorium basah, yang secara eksperimental dapat menjawab tantangan keberadaan dan konsekuensi dari perubahan metilasi pada gen kandidat kardiovaskular yang dapat disebabkan oleh paparan asap tembakau dalam kultur sel yang sesuai tampaknya belum cukup. Bukti

konsep yang berhasil untuk investigasi semacam itu dapat ditemukan dalam literatur tentang gejala sisa maligna dari merokok, 1 termasuk studi lanjutan untuk mendukung relevansi fungsional dari metilasi epigenomik.



**GAMBAR 10.** Beberapa struktur kausal yang jelas yang dapat menjelaskan hubungan antara merokok tembakau, metilasi F2RL3, dan risiko penyakit kardiovaskular. A, Merokok dapat meningkatkan risiko kardiovaskular melalui efek langsung pada metilasi F2RL3 dan ekspresi reseptor 4 (PAR4) yang diaktifkan proteinase berikutnya. Metilasi B, F2RL3 mungkin dipengaruhi secara terbalik oleh perubahan terkait merokok dalam biologi kardiovaskular (misalnya, pengikatan faktor transkripsi yang sering di wilayah F2RL3 yang disebabkan oleh reaksi proinflamasi dapat menghambat metilasi F2RL3 pasif<sup>54</sup> pada subjek yang merokok). C, metilasi F2RL3 mungkin hanya menjadi proksi yang baik dari paparan merokok dan risiko terkait.<sup>34</sup>

Studi longitudinal, yang lebih cocok dilakukan pada skala yang berbeda dari populasi ke jaringan dan sel tertentu dengan penilaian paparan berulang, pola metilasi, dan fenotipe (endo) yang dipilih dengan cermat termasuk tingkat ekspresi gen, mungkin menjadi pendekatan yang paling menjanjikan untuk menyelesaikan masalah ini. Pertanyaan kausalitas dalam hubungan antara merokok, metilasi DNA diferensial,

dan penyakit kardiovaskular. Pendekatan randomisasi Mendelian, yang menggunakan lokus sifat kuantitatif metilasi sebagai variabel instrumental, juga dapat membantu dalam beberapa kasus, tetapi bergantung pada ketersediaan penanda yang cukup kuat dan berbagai kondisi lain yang tidak selalu dapat dipenuhi.

Terlepas dari kausalitas, mengidentifikasi hubungan korelasional sederhana antara perbedaan epigenetik antar individu dan hasil klinis memiliki manfaat tersendiri, karena dapat membantu meningkatkan prediksi dan stratifikasi risiko kardiovaskular untuk tujuan pencegahan, intervensi, dan upaya rehabilitasi yang ditargetkan. Tampaknya menjanjikan bahwa F2RL3 metilasi adalah prediktor prognosis yang jauh lebih baik pada pasien kardiovaskular daripada yang dilaporkan sendiri, perilaku merokok yang divalidasi *cotinine*. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengklarifikasi seberapa baik metilasi F2RL3 atau penanda epigenetik lainnya berkorelasi dengan risiko kardiovaskular terkait merokok, yang menurun hanya secara perlahan, setelah berhenti merokok dan mungkin direfleksikan lebih baik oleh perubahan epigenetik daripada penanda lainnya. Epigenetik tidak akan merevolusi prediksi risiko kardiovaskular, tetapi dapat berkontribusi pada model stratifikasi risiko multimodal di masa depan.

Harapan terbesar dari pendekatan epigenomik adalah untuk mengidentifikasi gen baru yang penting untuk manifestasi kardiovaskular dari merokok. Meskipun pada prinsipnya tampaknya hal ini dimungkinkan, masih harus dilihat apakah epigenetik benar-benar akan memberikan dalam hal ini dan apakah epigenetik penyakit kardiovaskular sebenarnya berbeda secara substansial antara subjek yang merokok dan yang tidak merokok.

Terlepas dari tujuan yang paling jelas dari studi epigenetik pada penyakit kardiovaskular pada orang yang merokok, juga telah disarankan untuk menggunakan metode tersebut untuk mengidentifikasi zat tertentu yang terkandung dalam asap tembakau yang bertanggung jawab untuk pengembangan penyakit yang berhubungan dengan merokok.<sup>46</sup> Ini bisa jadi digunakan (atau disalahgunakan) di area perdebatan pengurangan dampak buruk produk tembakau, misalnya, dengan merancang dan

mempromosikan produk tembakau “lebih sehat” yang tidak memengaruhi metilasi F2RL3 (tetapi mungkin mempertahankan potensi karsinogenik dan patogen lainnya). Kurang lebih di ujung lain dari spektrum aplikasi yang mungkin, informasi tentang modifikasi jangka panjang yang terkait dengan merokok tembakau dari materi genetik dapat dievaluasi dalam konteks intervensi motivasi untuk berhenti merokok. Misalnya, menghadapi wanita hamil yang merokok dengan fakta bahwa perilaku mereka menyebabkan perubahan nyata pada DNA bayi baru lahir di F2RL3 dan lokus spesifik lainnya dapat memberikan insentif tambahan untuk berhenti pada kelompok sasaran penting ini. Mekanisme epigenetik yang berbeda secara menarik tampaknya relevan dan dapat digunakan di pihak paternal: merokok dikaitkan dengan perubahan ekspresi microRNA dalam spermatozoa, yang mungkin juga berkontribusi pada hasil yang merugikan pada derivatnya.

## **b. Sistem Antioksidan**

Antioksidan didefinisikan sebagai zat yang mampu menghambat proses oksidatif dan menghambat reaksi kimia yang mentransfer elektron atau hidrogen ke agen pengoksidasi. Antioksidan menghambat produksi ROS dan radikal bebas. Antioksidan dapat dikategorikan dalam berbagai macam kriteria. Berdasarkan aktivitasnya terbagi atas antioksidan enzimatik dan nonenzimatik. Antioksidan enzimatik bekerja dengan memecah dan menghilangkan radikal bebas, contohnya; SOD, GPx, CAT dan glutathion reduktase. Antioksidan enzimatik mengubah produk oksidatif berbahaya menjadi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan kemudian menjadi air, dalam beberapa proses yang melibatkan ko-faktor seperti tembaga, seng, mangan, dan besi. Antioksidan nonenzimatik bekerja dengan mengganggu reaksi berantai dari radikal bebas. Contoh dari antioksidan nonenzimatik adalah  $\alpha$ -tokoferol, asam L- askorbat, koenzim Q10, flavonoid, albumin, dan molekul-molekul lain yang belum teridentifikasi. Berdasarkan kelarutannya antioksidan terbagi atas antioksidan yang larut air dan lemak. Antioksidan yang larut dalam air, misalnya; vitamin C, yang didapatkan dalam cairan seluler seperti sitosol atau matrik sitoplasma. Antioksidan yang larut dalam lemak,

misalnya; vitamin E, karotenoid, dan asam lipoik yang sebagian besar terletak di membran sel. Berdasarkan ukurannya, antioksidan terbagi atas molekul kecil dan besar. Antioksidan molekul kecil menetralkan ROS dengan proses yang disebut radical scavenging, contohnya; vitamin C, vitamin E dan karotenoid. Antioksidan molekul besar adalah seperti SOD, CAT, GPx dan albumin.

Superoksida dismutase adalah keluarga enzim yang mengkatalisis konversi  $O_2^-$  menjadi  $H_2O_2$ . Superoksida dismutase mengkatalisis metabolisme  $O_2^-$  menjadi  $H_2O_2$ , kemudian  $H_2O_2$  bergabung dengan ion logam transisi menghasilkan  $\bullet OH$ , atau menjadi  $H_2O$  oleh GPx atau CAT.<sup>7</sup> Superoksida bereaksi cepat dengan NO membentuk ONOO<sup>-</sup> yang sangat reaktif dengan reaksi sekitar 10 kali lebih cepat daripada SOD (kadar konstan:  $5-10 \times 10^9/M/s$ ). Pembentukan peroksinitrit menyebabkan penurunan ketersediaan hayati dan efek protektif NO. Peroksinitrit sebagai vasokonstriktor dan molekul sitotoksik yang menyebabkan kerusakan oksidatif pada protein, lipid, dan DNA. Peroksinitrit menurunkan sintase prostasiklin dan NO endotel.

Glutathione peroxidase adalah 85-kDa selenium-dependent protein yang mengkatalisis reduksi  $H_2O_2$  menjadi  $O_2$  dan  $H_2O$  dengan menggunakan GSH monomer sebagai donor elektron.<sup>21</sup> Glutathione peroxidase jumlahnya melimpah di sitoplasma, nukleus dan mitokondria. Glutathione peroxidase merupakan antioksidan utama yang larut dalam air dalam kompartemen sel dengan konsentrasi millimolar. Kadar GPx yang tinggi ditemukan pada cairan ekstraselular paru (sekitar 100  $\mu mol/l$ ), sedangkan dalam plasma darah konsentrasinya sangat rendah ( $<1 \mu mol/l$ ). Larutan GPx dalam buffer fosfat yang terpapar asap rokok fase gas menghasilkan penurunan GPx yang signifikan, terutama disebabkan oleh reaksi dengan akrolein, dan munculnya bersamaan dengan GPx yang teroksidasi.

Catalase adalah salah satu enzim antioksidan protein tetrahedral, dibentuk oleh empat kelompok heme yang mengkatalisis pelepasan  $H_2O_2$  menjadi  $O_2$  dan  $H_2O$  untuk mengurangi toksisitas dari  $H_2O_2$ . Catalase merupakan suatu enzim yang terdiri dari 4 subunit protein. Setiap subunitnya mengandung gugus Fe (III) yang terikat pada sisi aktifnya.

Tiap subunit biasanya juga mengandung satu unit *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogen* (NADPH) yang membantu menstabilkan enzim. Catalase ditemukan pada berbagai sel dan jaringan sebagai mekanisme proteksi terhadap stres oksidatif.

Miller *et al.* menemukan tes untuk mengukur status antioksidan total (SAT) di awal 1990-an. Keuntungan tes SAT adalah mengukur kapasitas antioksidan dari semua antioksidan dalam sampel biologis untuk diagnosis, prognosis, dan pencegahan penyakit.

Pengukuran SAT antara lain menggunakan metode *Ferric Reducing-Antioxidant Power* (FRAP), *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC) dan *Troloxequivalent Antioxidant Capacity* (TEAC). Pengukuran FRAP didasarkan pada reduksi ion ferric menjadi ion ferrous dengan spektrofotometri pada panjang gelombang 593nm. Metode ORAC didasarkan pada kemampuan konstituen plasma menjebak radikal peroksil yang terbentuk dari dekomposisi termal inisiator azo (ABAP-2,2'-azobis [2-amidino propana]) dan peluruhan fluoresensi  $\beta$ - phycoerythrin ( $\beta$ -PE) pada panjang gelombang eksitasi 540nm dan panjang gelombang emisi 565nm. Metode TEAC yang berdasarkan pembentukan ABTS+kation [2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] dan pembilasan konstituen antioksidan (misal serum atau makanan) yang diukur dengan spektrofotometri.

### c. Peran Sel-Sel Inflamasi dan Respons Imun

Respons imun, yang terdiri dari imunitas bawaan dan adaptif, memainkan peran penting dalam perkembangan penyakit kardiovaskular terkait paparan asap rokok. Makrofag merupakan sel imun yang berperan penting dalam proses aterogenesis. Makrofag yang berasal dari prekursor di sumsum tulang dan monosit dapat memfagositosis debris selular dan patogen. Makrofag juga dapat menstimulasi respons inflamasi melalui aktivasi sel imun lain seperti limfosit dan berbagai sitokin. Fungsi paling esensial dari makrofag pada proses aterogenesis adalah proses uptake dan deposisi lipid yang berhubungan dengan perkembangan penyakit aterosklerosis. Oxidized LDL merupakan bentuk lipid utama yang

dikenali oleh makrofag melalui scavenger receptors (SRs) seperti CD36 dan CD68. Reseptor tersebut memicu fagositosis ox-LDL yang kemudian akan meningkatkan kolestrol intraseluler. Kolestrol intraseluler akan dimetabolisme dan ditranspor ke penerima eksogen seperti HDL melalui protein efluks yaitu ATP-binding cassette (ABC) transporter, ABCA1 dan ABCG1.

Makrofag telah diketahui mempunyai beberapa bentuk populasi yang berbeda. Populasi makrofag yang berbeda dikelompokkan berdasarkan kerja makrofag akibat pengaruh sitokin tertentu. Populasi pertama merupakan populasi klasik yang disebut dengan M1 yang bersifat proaterogenik. Makrofag M1 dapat diaktivasi melalui sitokin Th1 seperti  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12p40, dan IL-12p35. Populasi alternatif adalah M2 yang bersifat antiinflamasi dan dapat diaktivasi oleh sitokin Th2 seperti IL-3 dan IL-4. Makrofag dapat berubah menjadi fenotip M1 ke M2 maupun sebaliknya tergantung sinyal sitokin spesifik. Sifat tersebut disebut sebagai plastisitas makrofag. Beberapa studi menunjukkan adanya perubahan rasio M1 dan M2 pada saat proses aterogenesis. Proses aterogenesis dapat disebabkan tidak hanya karena peningkatan makrofag proinflamasi tapi juga adanya penurunan dari makrofag antiinflamasi.<sup>8</sup> Hal ini didukung oleh penelitian Chen *et al.* yang menunjukkan adanya polarisasi makrofag saat proses aterogenesis. Makrofag M1 lebih dominan pada fase awal aterogenesis dan masih bersifat asimtomatik.<sup>90</sup> Seiring dengan berjalannya proses aterogenesis, M2 menjadi semakin dominan ketika memasuki fase akhir aterogenesis yang telah bersifat simtomatik.

Makrofag M1 dapat dideteksi menggunakan metode imunohistokimia dengan penanda ox-LDL Scavenger Receptors (ox-LDL SRs), CD36 dan CD68. Penanda CD36 dapat mendeteksi baik M1 dan M2 yang terletak pada membran plasma sedangkan CD68 terletak pada permukaan lisosom. Penanda CD163, Macrophage Receptor (MR) dan Dectin-1 merupakan marka spesifik dari M2. Macrophage receptor merupakan protein reseptor membran tipe 1 yang banyak ditemukan pada permukaan makrofag yang memediasi endositosis saat proses fagositosis. Dectin-1 merupakan reseptor beta-glucan yang diekspresikan pada leukosit untuk memediasi respons imun terhadap karbohidrat dan polisakarida. Selain itu, Dectin-1

juga berhubungan dengan produksi sitokin IL-10 yang berperan dalam perubahan fenotip makrofag menjadi M2b atau *regulatory macrophage*. Marka yang digunakan pada spesies Murine adalah marka CD38 yang dapat secara spesifik mendeteksi M1 sedangkan M2 dapat dideteksi secara spesifik menggunakan marka Arginase-1 sebesar 24% dan Early growth response protein 2 (Egr2) sebesar 70%.

Sel Limfosit T adalah respons imun adaptif yang diaktivasi oleh antigen spesifik melalui T cells receptor (TCR).<sup>46</sup> Antigen yang disajikan dari makrofag dan sel dendrit harus melalui dua sinyal. Sinyal pertama adalah ligasi reseptor antigen pada APCs terhadap *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) seperti; Ox-LDL, antigen mikroba, dan heat shock proteins 60 (HSP60). Sinyal kedua adalah ligasi molekul ko-stimulasi CD28 pada sel T limfosit yang kemudian berinteraksi dengan CD80 atau CD86 pada APCs. Sel T Limfosit juga dapat diaktifkan oleh interaksi antara CD40-ligan (CD40L atau CD154) dan CD40 pada APCs, seperti makrofag, sel B limfosit, sel dendrit, sel endotel, dan VSMCs.

Major Histocompatibility Complex (MHC) diekspresikan pada permukaan sel yang disajikan oleh APCs berinteraksi dengan sel T dan kemudian berdiferensiasi menjadi sel T CD4+ dan T CD8+. Terdapat dua tipe MHC yaitu MHC kelas I dan MHC kelas II. Sel T CD4+ yang dikenal sebagai sel Th, mengikat antigen yang berasosiasi dengan molekul MHC kelas II. Sel Th membantu sel-sel lain dari sistem kekebalan tubuh seperti B limfosit, sel fagosit dan sel TCD8+ untuk melakukan fungsinya. Sedangkan sel T CD8+ atau cytolytic T cells (CTL) mengenali antigen melalui ekspresi molekul MHC kelas I.

Sel T CD4+ lebih dominan dibandingkan sel CD8+ pada patogenesis awal aterosklerosis. Sel T CD4+ diklasifikasikan menjadi sel T efektor CD4+ dan sel T regulator CD4+.<sup>27</sup> Sel T efektor CD4+ berdiferensiasi menjadi Th1 atau Th2 akibat pengaruh beberapa sitokin.<sup>46</sup> Sel Th1 mengaktivasi sitokin tertentu seperti IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-3, TNF- $\alpha$  dan TNF- $\beta$ , yang memperkuat respons inflamasi.

Sel Th2 menyekresi sitokin antiinflamasi seperti IL-4, IL-5, IL-10, dan IL-13 dan menginduksi sel B untuk menghasilkan immunoglobulin seperti IgM dan IgG yang memiliki efek ateroprotektif. Antibodi anti-

oxLDL IgM memberikan perlindungan terhadap aterosklerosis dengan menekan fagositosis Ox-LDL oleh makrofag. Sel Th1 menginduksi aktivasi makrofag dan memicu inflamasi, sebaliknya sel Th2 menekan inflamasi dan meredam aktivitas makrofag.<sup>46</sup> Sitokin yang disekresikan oleh sel Th1 dan Th2 memiliki efek saling menghambat.

Makrofag dapat berpolarisasi menjadi subtype M1 atau M2, bergantung pada sinyal yang diterima, polarisasi M1 diinduksi respons imun yang diperantarai Th1 seperti IFN- $\gamma$  dan polarisasi M1 diinduksi oleh sitokin Th2 seperti IL-4 dan IL-13.<sup>8,24</sup>

IFN- $\gamma$  dan IL-12 menekan respons Th2 sedangkan IL-4 dan IL-10 menghambat jalur Th1 dan sekresi sitokin. Ketidakseimbangan Th1 dan Th2 memainkan peran penting dalam perkembangan aterosklerosis dan ruptur plak aterosklerosis.<sup>27</sup> Subtype ketiga dari sel T efektor CD4<sup>+</sup> adalah Th17 yang dapat melepaskan beberapa sitokin dan kemokin proinflamasi, mengatur angiogenesis, sintesis matriks metalloproteinase dan CRP.<sup>27</sup>

Sel T sitotoksik (CTL atau sel T CD8<sup>+</sup>) didapatkan pada lesi lanjut aterosklerosis.<sup>27</sup> Sel T CD8<sup>+</sup> berfungsi proaterogenik karena dapat meningkatkan ukuran lesi dan perekrutan sel-sel inflamasi lain ke lokasi lesi ketika dirangsang dengan agonis CD137.<sup>26</sup>

Sel T regulator (Treg) berperan dalam penghambatan dan penekanan inflamasi serta mengatur respons imun adaptif. Sel Treg menghambat sel T efektor CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> melalui sekresi sitokin antiinflamasi seperti IL-10 dan TGF- $\beta$ .

Pada lesi aterosklerosis, TGF- $\beta$  dari makrofag berperan dalam proliferasi, diferensiasi, migrasi, adhesi, apoptosis sel dan produksi matriks ekstraseluler. Transforming Growth Factor- $\beta$  mengatur vasodilatasi dan vasokonstriksi melalui induksi ekspresi ET-1 pada sel endotel. Transforming Growth Factor- $\beta$  memiliki peran ganda dalam aterosklerosis yaitu proaterosklerotik dengan meningkatkan proliferasi VSMCs dan antiaterosklerotik dengan menurunkan perekrutan sel inflamasi, adhesi trombosit, dan aktivasi makrofag.

Interferon- $\gamma$  adalah sitokin proaterogenik dan inhibitor pertumbuhan sel endotel, serta menginduksi produksi mediator inflamasi lipid melalui sekresi fosfolipase A2.<sup>36</sup> Interferon- $\gamma$  yang disekresikan oleh Th1 dan IL-

12 yang disekresikan oleh sel dendritik dan makrofag dapat mengurangi stabilisasi plak dan menginduksi ruptur plak.

C-reactive protein adalah protein annular dan pentamerik yang meningkat sebagai respons terhadap inflamasi. Protein ini berikatan dengan fosfokolin di permukaan sel yang mati atau sekarat, mengaktifkan sistem komplemen dan kemudian mempromosikan fagositosis oleh makrofag. C-reactive protein disintesis di hati dan dapat diproduksi oleh sel-sel inflamasi dan adiposit. C-reactive protein meningkat pada kondisi cedera, infeksi, dan rangsangan inflamasi lainnya. Produksi CRP di hati dirangsang oleh stimulasi IL-6 dan kadarnya stabil dalam jangka panjang. Kadar CRP yang beredar terkait dengan beberapa faktor risiko penyakit kardiovaskular, seperti obesitas, merokok, tekanan darah tinggi, kadar apolipoprotein B, kadar glukosa darah puasa, kadar serum fibrinogen, kadar trigliserida dan kolesterol high-density lipoprotein (HDL). Ridker *et al.* menunjukkan bahwa CRP sebagai biomarka yang lebih efektif untuk penyakit kardiovaskular daripada LDL.<sup>24</sup>

C-reactive protein menginaktivasi endotel dengan cara merangsang ekspresi molekul adhesi seperti; ICAM-1, VCAM-1, E-selectin dan MCP-1. C-reactive protein juga mengaktifkan makrofag untuk mengekspresi sitokin dan Tissue Factor (TF) yang menyebabkan peningkatan penyerapan LDL oleh lipoprotein. C-reactive protein melemahkan aktivitas eNOS sehingga mengurangi ketersediaan hayati NO sebagai vasodilator dan meningkatkan konsentrasi ET-1 sebagai vasokonstriktor.

Interleukin 6 adalah sitokin yang memiliki fungsi respons imun bawaan dan adaptif. Interleukin 6 disintesis oleh monosit, sel-sel endotel, fibroblas dan sel lainnya. Aktivasi IL-6 juga dapat dipicu oleh sitokin IL-1 dan TNF- $\alpha$ . Interleukin 6 terlibat dalam serangkaian proses imun dan sebagai penanda terjadinya inflamasi karena terlibat dalam regulasi CRP. Ramos *et al.* telah membuktikan bahwa plak aterosklerosis pada sindrom koroner akut mengekspresikan berbagai penanda inflamasi seperti CRP, TNF- $\alpha$ , fibrinogen dan IL-6, namun hanya IL-6 yang berkorelasi signifikan terhadap terjadinya kejadian kardiovaskular di masa depan).<sup>24</sup> Interleukin 6 memegang peran utama dalam patogenesis aterosklerosis fase akut. Tikus dengan *knockout* dari gen IL-6 menunjukkan adanya penurunan

proses inflamasi yang ditunjukkan dengan terganggunya produksi protein fase akut seperti CRP. Sedangkan peningkatan kadar IL-6 juga mampu memprediksi mortalitas penyakit aterosklerosis dalam lima tahun ke depan.

Interleukin 6 mempunyai berbagai macam fungsi dalam proses inflamasi aterosklerosis. Pertama IL-6 akan menstimulasi pembentukan acute-phase reactant melalui proses di hepar untuk membentuk CRP. C-reactive protein inilah yang kemudian dapat menyebabkan berbagai macam patologi seperti disfungsi endotel, peningkatan makrofag dan faktor kemotaktik untuk menarik sel-sel inflamasi yang lainnya. Dalam perkembangan lesi aterosklerosis, IL-6 sebagian besar bertanggung jawab untuk mengoordinasikan masuknya sel-sel inflamasi ke endotel. Sel-sel endotel yang dipengaruhi oleh IL-6 memicu pembentukan kemokin dan meningkatkan ekspresi ICAM-1, yang bersama-sama memicu perekrutan dan transmigrasi leukosit ke lapisan intima pembuluh darah.

Dalam homeostasis, endotel menciptakan keseimbangan antara faktor antitrombotik (NO, prostasiklin, protein C dan tPA) dan faktor protrombotik (ET-1, oksidan radikal, Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1), tromboksan A2, fibrinogen dan TF) (Smiljic, 2017). Oxidized LDL dapat meningkatkan regulasi growth factor (GF) seperti PDGF untuk migrasi dan bFGF untuk proliferasi, serta meningkatkan ekspresi PAI-1 yang mendukung aterotrombosis.<sup>7,36</sup> Interaksi antara Ox-LDL, CD36 dan trombosit menyebabkan agregasi dan aktivasi trombosit yang kemudian mengekspresikan LOX-1 untuk memediasi adhesi sel endotel dan meningkatkan pelepasan ET-1.

Sitokin inflamasi seperti TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8 dan IFN- $\gamma$  merangsang makrofag dan VSMCs untuk mengekspresikan faktor koagulasi dan TF. Tissue Factor adalah protein protrombotik yang berfungsi sebagai inisiator kuat koagulasi melalui interaksi dengan faktor koagulasi VII. Oxidized-LDL yang terakumulasi dalam makrofag dapat menginduksi apoptosis, menghasilkan lipid dan pelepasan TF.

Cluster of differentiation 40 adalah protein transmembran tipe I dari famili TNF yang berbentuk dimer dan menjadi trimer saat mengikat Cluster of differentiation 40 Ligan (CD40L). Cluster of differentiation 40

diekspresikan oleh sel-B, sel epitel, sel neuronal, fibroblas, sel pembuluh darah, dan trombosit. Cluster of differentiation 40 diregulasi 6–12 jam setelah stimulasi dan menetap pada permukaan sel selama 24–72 jam. Cluster of differentiation 40 ligand dan soluble CD40L (sCD40L) berinteraksi dengan CD40 pada proses inflamasi.<sup>36</sup> Trombosit yang telah diaktifkan akan mengekspresikan CD40L yang akan menginduksi sel endotel untuk mengeluarkan kemokin dan molekul adhesi serta mempromosikan perlekatan makrofag pada endotel.

Faktor Von Willebrand (vWF) adalah glikoprotein yang disintesis dalam sel endotel dan berperan merangsang adhesi dan agregasi trombosit dalam jaringan yang. Trombosit membentuk kompleks glikoprotein (GP) IIb-IIIa dengan mengikat beberapa ligan, termasuk fibrinogen, vWF, fibronektin, dan vitronektin. Trombosit menginduksi masuknya kalsium intraseluler untuk melepaskan butiran  $\alpha$  dan granula padat, seperti 5- hydroxytryptamine, adenosine diphosphate (ADP), dan adenosine triphosphate (ATP). Butiran  $\alpha$  termasuk tromboksan A2, leukotriene B4 (LTB4), dan berbagai mediator proinflamasi akan memengaruhi VSMCs, sel endotel, monosit dan makrofag.

Merokok merusak kemampuan sel endotel untuk mencegah trombosis, karena merokok meningkatkan kadar vWF dan TF melalui penurunan NO. Seberapa tinggi kadar vWF yang mungkin berkontribusi terhadap peningkatan trombosis dan aterogenesis pada perokok tidak dijelaskan secara jelas.

Tromboksan A2 adalah vasokonstriktor kuat yang berasal dari asam arakidonat cyclooxygenase 1 (COX)-1.<sup>18</sup> Peningkatan kadar tromboksan A2 terjadi pada perokok. Peningkatan ekskresi metabolit tromboksan pada urin perokok, seperti 2,3-dinor tromboxan B2 (2,3-dinorTxB2) dan 11- dehydro TxB2, digunakan sebagai penanda aktivasi trombosit yang peningkatannya sesuai dengan dosis rokok yang dikonsumsi.

Fibrinogen adalah glikoprotein yang disintesis di sel hati. Fibrinogen berfungsi mengikat protein permukaan GP IIb/IIIa. Fibrinogen merangsang migrasi VSMCs dan agregasi trombosit serta meningkatkan viskositas darah yang berhubungan dengan aterosklerosis. Liu *et al.* meneliti adanya peningkatan kadar fibrinogen pada perokok.<sup>87</sup>

Keadaan prokoagulan dinilai dengan adanya perubahan keseimbangan antara t-PA dan PAI-1.<sup>17</sup> Barua *et al.* membuktikan bahwa rasio t-PA dan PAI-1 menurun secara signifikan pada perokok.<sup>34</sup> Kadar PAI-1 dapat menjadi penanda disfungsi endotel pada perokok muda.<sup>10</sup> Rokok menginduksi perubahan fibrinolisis dengan menghambat pelepasan t-PA dan meningkatkan kadar PAI-1 endotel.<sup>18</sup> Sel endotel melepaskan t-PA, yaitu protein yang berperan dalam fibrinolisis dan menghambat trombosis. Plasminogen Activator Inhibitor-1 disekresikan oleh sel endotel untuk menghambat efek t-PA.



# 03

## Jintan Hitam



**A**lam kita dipenuhi oleh tumbuhan dan bahan alam yang berpotensi dalam bidang kesehatan. Beberapa tahun terakhir pengobatan alternatif dan tradisional amat berkembang, banyak penelitian yang menguji tanaman herbal sebagai terapi medis. Herbal kini banyak diteliti dan dipilih karena dianggap aman dan tidak memiliki efek samping berbahaya dibandingkan dengan obat-obatan. Kandungan dalam tanaman herbal yang diduga memiliki khasiat penyembuhan yakni zat fitokimia aktif yang memiliki beragam golongan seperti saponin, alkaloid, terpen dan glikosida.

## 1. JINTAN HITAM

Jintan hitam (*Nigella arvensis*) adalah tanaman yang berbunga tahunan dengan tinggi sekitar 20–90 cm. Bunga jintan hitam memiliki 5–10 kelopak yang berwarna putih, kuning, merah muda, biru pucat, ataupun ungu pucat. Buahnya berupa kapsul besar yang terdiri dari 3–7 folikel dan berisi beberapa biji. Biji dari jintan hitam berbentuk kecil *dicotyledonous*, *trigonus*, *angular*, *tubercular*, hitam di luar dan putih di dalam, berbau aromatik dengan rasa pahit.<sup>48</sup>



**GAMBAR 11.** Bunga Jintan Hitam.<sup>49</sup>

Jintan hitam dalam bahasa arab dikenal sebagai *Habbatus Sauda*, *Kabodan*, *Kamun Aswad*, *Shoneez* atau *Habbat al Baraka*. Jintan hitam dikenal di seluruh dunia dengan banyak nama seperti *coriander* (Romawi), *carvi* (Perancis), *Sino*, *Sheenon*, *Kamaazaruus* (Yunani), *Shoneez*, *Siyah Dana* (Persia), *schwarzkummel* (Jerman), *kalonji* (Hindi/Urdu), *Small Funnel* atau *Black Cumin* (Inggris), *Kalodi* (Sindi), *Susavi*, *Krishna jiraka*, *Upakuncika*, *Karvi*, *Sthula Jiraka*

(Sanskrit), *kezah* (Hebrew) *chernushka* (Rusia), *Qarachurak Audi* (Turkish), *siyahdaneh* (Persian), *Kalaunji Jirum*, *Kadujeeroo* (Gurjati), *Karijirige* (Kanada), *Tukhme Gandana* (Kasmiri), *Kalaunji-jire*, *kalerjire* (Marathi), *Karinchirakam* (alyalam), *Kavanji* (Panjabi), *Karunjarakam* atau *Karunjiragam* (Tamil) dan *Nallajilakara* (Telugu). Jintan hitam berasal dari kata Latin, *nigellus*, berarti hitam, sativa diterjemahkan sebagai “benih berkat”.<sup>49,50</sup>

Jintan hitam telah banyak dibahas dalam artikel kuno mesir, disebutkan bahwa jintan hitam dideskripsikan sebagai *panacea* yang berarti “penyembuh penyakit dan masalah kesehatan”. Khasiat jintan hitam telah banyak tertulis di literatur kuno maupun literatur terbaru. Ditunjang meningkatnya popularitas pengobatan tradisional dan alternatif, jintan hitam semakin banyak diteliti manfaat serta kegunaannya.



**GAMBAR 12.** Biji Jintan Hitam.<sup>49</sup>

## Klasifikasi taksonomi

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Domain	: <i>Eukarya</i>
Subkingdom	: <i>Tracheobionta</i>
Superdivisi	: <i>Spermatophyta</i>
Filum	: <i>Magnoliophyta</i>
Kelas	: <i>Magnoliopsida</i>
Order	: <i>Ranunculales</i>
Famili	: <i>Ranunculaceae</i>
Genus	: <i>Nigella</i>
Species	: <i>Nigella sativa</i> . <sup>47,51</sup>

## 2. SUBSTANSI DAN KEGUNAAN JINTAN HITAM

Biji jintan hitam memiliki lebih dari 100 unsur kimia.<sup>52</sup> Kandungan biji jintan hitam mengandung minyak atsiri (0,40–2,5%) dan *fixed oil* (32–40%), protein (16–20,85%), karbohidrat (31,0–33,9%), serat (5,50–7,94%), alkaloid, asam amino (alanin, arginin, isoleusin, lisin, triptofan, tirosin, treonin, asparagin, sistin, glisin, asam glutamat, metionin, dan prolin), tanin, saponin, mineral (zat besi, kalsium, kalium, magnesium, *zinc*, fosfor, selenium dan tembaga (1,79–3,44%)), vitamin A, B1, B2, B3, C dan E, tiamin, niasin serta piridoksin.<sup>13,48,52,53,54</sup>

Kandungan bioaktif jintan hitam adalah *thymoquinone* dengan turunannya seperti *dithymoquinone*, *thymohydroquinone*, dan *thymol* (30–48%), *p-cymene* (7–15%), *carvacrol* (6–12%), *4-terpineol* (2–7%), *t-anethole* (1–4%), *sesquiterpene longifolene* (1–8%), *safranal*,  $\alpha$ -*thujene*, *thymol*,  $\beta$ -*pinene*,  $\alpha$ -*pinene*, dan  $\gamma$ -*terpinene*.<sup>11,13,14,52</sup>

Kandungan alkaloid jintan hitam adalah *alkaloid isoquinoline* (misalnya *nigellcimine* dan *nigellcimine-N-oksida*) dan *pyrazole alkaloid* atau *indazole ring bearing alkaloids* (misalnya *nigellidine* dan *nigellicine*) serta asam lemak tak jenuh (80–84%) yaitu linoleat (50–60%), asam oleat (23,4%), asam *ecodadienoic* (3%), dan asam *dihomolinoleic* (10%) serta asam lemak jenuh (14–20%) yaitu palmitat dan asam stearat.<sup>14,51,55,56</sup>

Jintan hitam adalah obat tradisional yang digunakan di negara Timur Tengah, Asia, Eropa Selatan, India, Pakistan, Suriah, Arab Saudi, dan Turki, serta Mediterania Selatan. Jintan hitam adalah tanaman herbal dari keluarga *Ranunculacea* (*Buttercup*), yang digunakan sebagai bronkodilator, dengan sifat-sifat gastroprotektif, hepatoprotektif, antitumor, antidiabetes, antihipertensi, antioksidan, antijamur, imunomodulator, antiinflamasi, analgesik, antivirus, antipiretik, kontrasepsi, antimikroba, antikonvulsan, antitusif, antikanker, antihiperlipidemik.<sup>48,52,53,56,57,58</sup>

Indonesia merupakan salah satu penghasil jintan hitam yang berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai modalitas terapi kuratif maupun preventif berbagai kondisi penyakit, salah satunya adalah penyakit kardiovaskular. Berbagai kandungan kimia pada jintan hitam menyebabkan berbagai efek terapeutik tersebut. Senyawa aktif dominan yang terkandung dalam jintan hitam terdiri dari *thymoquinone* dan alkaloid.<sup>48,52,53,56,</sup>

Penelitian oleh penulis telah mengidentifikasi kandungan jintan hitam yang ditanam di Indonesia. Senyawa aktif dominan yang terkandung pada jintan hitam Indonesia dalam penelitian ini adalah asam linoleat (71,31%), asam palmitat (15,86%), *stearate* (4,69%), *octadecadienal* (3,8%), *beta monolinolein* (1,8%), dan *thymoquinone* (0,28%). Komposisi jintan hitam pada penelitian ini berbeda dengan komposisi jintan hitam dari Iran dan India. Jintan hitam Iran mengandung senyawa aktif dominan yaitu asam linoleat (49,93%), *thymoquinone* (8,26%), *p-cymene* (8,19%), asam askorbat (8,07%) dan asam oleat (2,86%). Jintan hitam dari India mengandung senyawa aktif dominan asam linoleat (61,85%), asam oleat (18,97%), asam askorbat (6,81%) dan *thymoquinone* (0,72%).<sup>51</sup> Kandungan jintan hitam India pada penelitian oleh Dinakaran *et al.* yaitu *9-eicosyne* (63,04%), asam linoleat (13,48%), asam palmitat (9,68%), *p-cymene* (2,54%) dan *thymoquinone* (1,86%).<sup>11,49</sup> Dari hasil tersebut dapat diketahui bahwa jintan hitam lokal yang berasal dari Indonesia memiliki perbedaan komposisi kandungan dengan jintan hitam yang berasal dari Iran dan India. Perbedaan komposisi tersebut tentunya akan memberikan efek biologik dan farmakodinamik yang berbeda juga pada tubuh.

**TABEL 1.** Kandungan senyawa aktif pada jintan hitam Indonesia.<sup>82</sup>

Substrat	Konsentrasi
Asam Linoleat	71,31%
Asam Palmitat	15,86%
Stearat	4,69%
Oktadecadienal	3,8%
Beta-monolinolein	1,8%
Timokuinon	0,28%

Penggunaan biji dan minyak jintan hitam dalam pengobatan tradisional sudah ada lebih dari 2.000 tahun yang lalu dan digambarkan sebagai '*Melanthion*' oleh Hippocrates dan Discroides.<sup>56</sup> Minyak jintan hitam ditemukan di beberapa situs dari Mesir kuno, termasuk di sisa-sisa makam *Tutankhamun* yang membuktikan bahwa jintan hitam telah digunakan sejak zaman kuno. Biji dan minyak jintan hitam digunakan oleh Hippocrates untuk memperkuat jantung, memperbaiki pencernaan, mengobati sengatan ular dan kalajengking, abses, ruam kulit, infeksi dan influenza. Sedangkan Pedanius Dioscorides menggunakan minyak jintan hitam untuk menghilangkan sakit kepala dan sakit gigi, membersihkan hidung tersumbat dan menghancurkan *enterozoa*. Sedangkan oleh Cleopatra, Ratu Mesir, jintan hitam digunakan untuk kesehatan dan kecantikan.<sup>11,48</sup> Biji jintan hitam digunakan oleh Ratu Nefertiti untuk perawatan kulitnya.<sup>11</sup>

Dokter Persia dan filsuf Ibnu Sina menyebutkan jintan hitam dalam risalah medis "*Canon of Medicine*" dan menyatakan bahwa jintan hitam dapat digunakan untuk upaya preventif dan restoratif kelelahan karena disebut merangsang energi tubuh. Ibnu Sina juga merekomendasikan jintan hitam untuk demam, selesma, sakit kepala, sakit gigi, penyakit kulit, luka, jamur, parasit, dan cacing serta melawan gigitan dan sengatan binatang beracun.<sup>11</sup>

Senyawa bioaktif yang terkandung dalam jintan hitam terbukti mampu bersifat antioksidan dengan mekanisme *radical scavenging* dan meningkatkan aktivitas enzim antioksidan di dalam tubuh. Sifat antioksidan dari jintan hitam ditentukan oleh kandungan *thymoquinone*,

fenol (seperti *ferulic acid*, *salicylic acid*, *sinapinic acid*, *quercetin* dan kaempferol) dan asam lemaknya (seperti asam linoleat, asam palmitat, asam oleat dan stearat). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa jintan hitam lokal Indonesia juga mengandung komponen-komponen tersebut sehingga jintan hitam lokal Indonesia juga berpotensi memiliki sifat antioksidan yang tinggi.

Studi oleh Sen *et al.* dan Singh *et al.* membuktikan fenol merupakan salah satu senyawa aktif antioksidan yang terkandung dalam jintan hitam. Total komponen fenol dalam jintan hitam memiliki kontribusi yang signifikan terhadap sifat antioksidan jintan hitam yang ditunjukkan dengan adanya korelasi positif yang signifikan antara total komponen fenol dan aktivitas antioksidan berupa kemampuannya untuk mendonorkan ion hidrogen pada radikal bebas dan mereduksi reaksi Fenton yaitu mengurangi radikal bebas *OH* melalui proses *chelating* ion *ferric*. Kemampuan komponen fenol jintan hitam juga setara dengan antioksidan sintesis *butylated hydroxyanisole (BHA)* dan *butylated hydroxytoluene (BHT)* serta *iron chelator Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)*

Kandungan asam lemak juga menyumbang kemampuan antioksidan jintan hitam. Rasoli *et al.* menunjukkan bahwa ekstrak jintan hitam mengandung hampir 50% asam lemak seperti asam linoleat dan asam oleat serta terbukti mampu mengurangi reaksi Fenton yang terjadi menggunakan metode *Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assay*. Pengurangan reaksi tersebut disertai dengan adanya penurunan kerusakan jaringan ginjal dan hepar akibat radikal bebas.

Kandungan *monoterpen* jintan seperti *thymoquinone* juga terbukti memiliki peran dalam sifat antioksidan jintan hitam. Burits dan Bucar telah meneliti kemampuan antioksidan dari isolasi *thymoquinone* dan membandingkannya dengan ekstrak minyak jintan hitam.<sup>56</sup> Hasilnya, *thymoquinone* ternyata memiliki IC<sub>50</sub> (kekuatan penghambatan radikal bebas hingga 50%) pada *2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radicals scavenging assay* yang cukup tinggi yaitu sebesar 211 µg/mL yang merupakan 46% dari IC<sub>50</sub> ekstrak minyak jintan hitam yang sebesar 460 µg/mL. Dari hasil tersebut Burits dan Bucar menyimpulkan bahwa *thymoquinone*, yang merupakan komponen dominan dari minyak jintan hitam pada

penelitiannya, berperan sebesar 46% dari keseluruhan kemampuan *radicals scavenging* dari jintan hitam. *Thymoquinone* dan kandungan lain jintan hitam yaitu *caroacrol* juga memiliki kemampuan mengurangi reaksi Fenton yang diukur dengan metode *assay for site-specific actions* dan *deoxyribose degradation*.

Metode ekstraksi dan jenis pelarut memengaruhi komposisi kandungan ekstrak jintan hitam yang didapat.<sup>51,64</sup> Penelitian Kausar *et al.* berhasil mengidentifikasi bahwa ekstraksi maserasi dengan pelarut metanol jintan hitam India mengandung kadar *thymoquinone* paling tinggi (4,27%) dibandingkan dengan pelarut *hexane* (3,67%) dan *petroleum ether* (2,9%) dengan menggunakan metode *HPLC*.<sup>51</sup> Iqbal *et al.* menunjukkan bahwa *thymoquinone* jintan hitam dari India terdeteksi oleh *HPLC* dengan komposisi tertinggi pada pelarut *benzene* kemudian pelarut *hexane* dan pelarut metanol.<sup>64</sup> Pelarut etanol dan air, kandungan *thymoquinone* sangat minimal. Hasil tersebut menunjukkan bahwa ekstraksi jintan hitam dengan pelarut *benzene* mengandung kadar *thymoquinone* paling tinggi. Ekstrak jintan hitam dengan *hexane* mengandung *thymoquinone* lebih tinggi 1,55 kali lipat dan *benzene* mengandung *thymoquinone* 10 kali lipat jika dibandingkan dengan pelarut metanol. Namun pelarut metanol masih menjadi pilihan untuk digunakan sebagai pelarut ekstraksi berbagai macam sumber antioksidan, mudah didapatkan dan mampu mengeluarkan kadar *thymoquinone* meskipun tidak secara maksimal.

Selain hasil tersebut, Iqbal *et al.* juga menemukan hasil lain yang menarik yaitu kadar *thymoquinone* ekstrak jintan hitam pada berbagai pelarut tersebut berkorelasi positif lemah terhadap aktivitas antioksidannya.<sup>64</sup> Aktivitas antioksidan tertinggi justru didapatkan pada ekstrak jintan hitam dengan pelarut air dan terendah pada pelarut metanol jika dibandingkan dengan standar *thymoquinone*. Meskipun ekstrak jintan hitam dengan pelarut air kandungan *thymoquinone* dapat diabaikan namun aktivitas antioksidan totalnya didapatkan paling tinggi, sehingga keberadaan senyawa bioaktif lainnya yang memiliki potensi antioksidan tidak dapat dikesampingkan. Hal tersebut menunjukkan bahwa *thymoquinone* dalam jintan hitam bukan satu-satunya senyawa aktif

yang memiliki aktivitas antioksidan, tetapi senyawa aktif lainnya juga dapat berkontribusi sebagai.

Dari pembahasan diatas, pemberian ekstrak etanol jintan hitam ditengarai dapat menghambat progresivitas disfungsi endotel sehingga mencegah terjadinya aterosklerosis melalui mekanisme antioksidannya.

*World Health Organization* merekomendasikan biji jintan hitam sebagai obat herbal maupun *phytochemically*. *Food and Drug Administration* (FDA) atau badan pengawas obat dan makanan Amerika Serikat merekomendasikan jintan hitam untuk mencegah penyakit dan memperlambat proses penuaan karena kandungan nutrisinya.<sup>49</sup>

### 3. THYMOQUINONE, KONSTITUEN AKTIF JINTAN HITAM

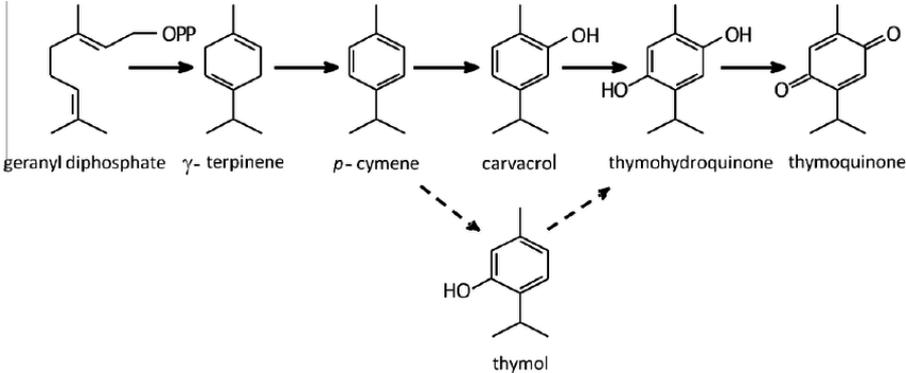
Senyawa atau produk metabolit sekunder dari biji jintan hitam yang paling dominan adalah minyak atsiri dan asam lemak. Salah satu senyawa yang terdapat pada minyak atsiri adalah monoterpen. *Thymoquinone* sendiri merupakan senyawa monoterpen 2-metil-5-isopropil-1,4-benzoquinone. Komponen utama yang termasuk golongan monoterpen adalah *α-thujene*, *p-cymene*, *γ-terpinene*, *fenchone*, *dihydrocarvone*, *thymoquinone*, *thymohydroquinone*, *carvacrol* dan komposisi dari senyawa-senyawa tersebut akan berbeda-beda tergantung usia biji jintan hitam.<sup>59</sup>

Metabolit sekunder pada tanaman tersebut berfungsi sebagai fungsi adaptasi dan juga pertahanan terhadap kondisi lingkungan disekitarnya seperti fungsi “imun” tanaman terhadap infeksi patogen dari luar ataupun melindungi kerusakan tumbuhan dari cahaya yang berlebihan.<sup>60,61,62</sup>

Biosintesis monoterpen ini akan menghasilkan produk berupa *γ-terpinen* yang nanti akan dibiosintesis menjadi senyawa *thymoquinone*. *Thymoquinone* mulai terbentuk pada biji jintan hitam setelah 40 hari setelah antesis (proses saat bunga sepenuhnya terbuka dan fungsional), kemudian mulai meningkat jumlahnya pada hari ke-50 dan puncak kadar *thymoquinone* adalah pada hari ke-65 setelah antesis. Penurunan kadar *thymoquinone* akan terjadi pada usia menjelang pematangan biji yaitu hari ke-70. Begitu pula komponen minor jintan hitam akan mengalami puncaknya pada hari ke-65 setelah antesis. Kandungan *thymoquinone*

banyak terdapat pada biji yang telah dihaluskan dengan kandungan terbanyaknya adalah pada kulit biji jintan hitam.<sup>59</sup>

*Thymoquinone* merupakan produk metabolisme sekunder yang terbentuk dari *geranyl diphosphate* yang dihubungkan ke  $\gamma$ -*terpinen* kemudian diaromatisasi ke dalam *p-cymene* dan diikuti dengan hidroksilasi *carvacrol* untuk menjadi *thymohydroquinone* dan *thymoquinone*, sedangkan hidroksilasi *thymol* sebagai jalur biosintesis alternatif.<sup>63</sup>



**GAMBAR 13.** Jalur biosintesis *thymoquinone*.<sup>63</sup>

Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa *thymoquinone* dari jintan hitam telah menunjukkan berbagai efek terapeutik. Uji coba klinis masih sangat jarang dilakukan sampai saat ini, sehingga kurang informasi mengenai cara ekstraksi jintan hitam yang dapat memaksimalkan kandungan dan stabilitas dari *thymoquinone*. Pada tahun 2018, Iqbal *et al.* melakukan penelitian yang bertujuan untuk mengekstrak jintan hitam dari India pada berbagai pelarut untuk menentukan pelarut mana yang paling efektif untuk mengeluarkan kandungan dan stabilitas *thymoquinone* secara maksimal.<sup>64</sup> Penelitian tersebut menunjukkan bahwa pelarut metanol, *hexane* dan *benzene* mampu mengeluarkan kandungan *thymoquinone* pada jintan hitam secara maksimal. Pelarut *benzene* diketahui paling maksimal dalam mengeluarkan kandungan *thymoquinone* pada jintan hitam. Pelarut metanol masih menjadi pilihan karena sering digunakan sebagai pelarut

ekstraksi berbagai macam sumber antioksidan, mudah didapatkan dan mampu mengeluarkan kadar *thymoquinone* pada jintan hitam dengan cukup tinggi.<sup>64</sup>

Penelitian oleh Mardisiwi menunjukkan ekstraksi jintan hitam lokal Indonesia menggunakan pelarut metanol mampu mengeluarkan kadar *thymoquinone* yang cukup tinggi yang diukur menggunakan *Reserved Phase High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC).<sup>65</sup> Metanol memiliki toksisitas akut yang tinggi dibandingkan etanol. Metanol memiliki LD50 yang lebih tinggi yaitu 13 ml/kgBB sedangkan etanol memiliki nilai LD50 sebesar 22,5 ml/kgBB. Pemberian methanol berlebihan akan menyebabkan berbagai gejala seperti defisit visual permanen, parkinson, asidosis metabolik, gagal ginjal, *multiple organ failure* hingga kematian.<sup>66</sup>

Sifat toksik *thymoquinone* dan *thymohydroquinone* dipelajari pada tikus dengan pemberian injeksi peritoneal *thymoquinone* untuk menentukan *Dosis Median Lethal* (LD50). Nilai LD50 yang rendah menunjukkan kemampuan *scavenging* yang lebih kuat, begitu pula sebaliknya jika nilai LD50 tinggi maka aktivitas *scavenging* menjadi lebih rendah. Studi oleh Ruberto dan Baratta, menunjukkan bahwa *thymoquinone* memiliki aktivitas *scavenging* yang paling tinggi (LD50 = 12,6 ± 0,0 µg/ml) diikuti oleh timol (13,0 ± 0,8 µg/ml), minyak esensial dari jintan hitam (14,56 ± 0,4 µg/ml) dan *carvacrol* (15,03 ± 0,0 µg/ml). Sedangkan LD50 untuk  $\alpha$ -*Thujene* (22 ± 0,1 µg/ml), *camphene* (23 ± 0,9 µg/ml), *bpinene* (19,4 ± 0,0 µg/ml), *p-cymene* (20 ± 0,4 µg/ml) dan  $\gamma$ -*terpinene* (20,03 ± 0,6 µg/ml).<sup>67</sup> Penelitian oleh Amina menyimpulkan bahwa kandungan total jintan hitam memiliki LD50 56,88 µg/ml, yang terkait dengan keberadaan *thymoquinone* dan *hydrothymoquinone*.<sup>68,69</sup>

#### 4. JINTAN HITAM, DISFUNSI ENDOTEL, DAN ATEROSKLEROSIS

Jintan hitam dan kandungannya dapat digunakan sebagai *radical scavenging* dan menghambat stres oksidatif. Komponen utama minyak jintan hitam yang digunakan sebagai antioksidan adalah *p-cymene* (34,1–39,9%) dan *thymoquinone* (17,2–25,9%) dengan jumlah kecil  $\beta$ -*pinene* (1,8–4,5%) dan  $\alpha$ -*Pinene* (1,3–4,4%).<sup>12</sup> Sedangkan menurut Kazemi, komponen

antioksidan utama pada minyak jintan hitam, adalah; *thymoquinone* (51%), *thymol* (25%) dan *carvacrol* (8%).<sup>67</sup> *Thymoquinone* pada jintan hitam memiliki aktivitas antioksidan yang cukup tinggi. Salah satu patogenesis penting dari disfungsi endotel yang kemudian menjadi aterosklerosis adalah adanya stres oksidatif yaitu ketidakseimbangan antara prooksidan dan antioksidan. Aktivitas antioksidan *thymoquinone* adalah dengan cara mengurangi produksi ROS dan menghambat peroksidasi lipid secara tidak langsung. *Thymoquinone* bekerja pada antioksidan enzimatik maupun nonenzimatik. Menurut Woo *et al.*, *thymoquinone* adalah scavenging  $O_2^-$  dan radikal bebas serta meningkatkan aktivitas enzim antioksidan seperti SOD, CAT, GPx, dan *Glutathione S-transferase*.<sup>67</sup> Hal ini sesuai dengan penelitian oleh Mansour *et al.*, yang menunjukkan bahwa *thymoquinone* dan *dithymoquinone* bekerja sebagai scavenger  $O_2^-$  dan radikal bebas lain.<sup>70</sup> Komponen antioksidan dari *thymoquinone* juga dapat bekerja melalui peningkatan fungsi enzim dalam metabolisme lipid dengan melindungi sel terhadap peroksidasi lipid.<sup>48</sup> Komponen minyak jintan hitam yang dapat menurunkan reaksi radikal bebas yang berhubungan dengan peroksidasi lipid adalah tokoferol, karotenoid, fosfolipid dan fenolik.<sup>71</sup>

Kanter *et al.* menyatakan bahwa minyak jintan hitam dapat menurunkan kadar MDA dalam darah dan meningkatkan aktivitas sistem pertahanan antioksidan pada tikus yang diberi karbon tetraklorida.<sup>72</sup> Penelitian Meral *et al.*, menunjukkan bahwa ekstrak jintan hitam secara oral setiap hari selama 2 bulan menurunkan konsentrasi MDA darah dan meningkatkan enzim GPx dan juga mencegah kerusakan hati pada kelinci model diabetes.<sup>73</sup> Er Sahin *et al.* juga melaporkan bahwa minyak jintan hitam memiliki sifat scavenging radikal bebas yang kuat dan menghambat peroksidasi lipid *subarachnoid* pada tikus yang diberi paparan dengan hidroksil reaktif, peroksil, dan radikal  $O_2^-$ .<sup>74</sup>

Selain kandungan *thymoquinone*, flavonoid dan vitamin seperti asam askorbat pada jintan hitam juga memiliki efek antioksidan. Sedangkan menurut Sadik *et al.*, aktivitas antioksidan jintan hitam dikaitkan dengan kandungan fenolik dan flavonoid.<sup>75</sup> Flavonoid adalah senyawa polifenolik yang bekerja sebagai antioksidan dengan menekan pembentukan ROS dan RNS.<sup>14</sup> Kapasitas antioksidan dihubungkan dengan parameter seperti

jumlah polifenol dan flavonoid; keragaman konstituen dan sinergismenya; serta potensial kinetik antioksidannya.<sup>71</sup> Penelitian oleh Houcher *et al.* menunjukkan dosis ekstrak jintan hitam sebesar 0,81 g/kgBB/hari yang diberikan selama 25 hari dapat meningkatkan status antioksidan total secara signifikan.<sup>76</sup> Penelitian oleh Alsuhaibani menunjukkan dosis ekstrak jintan hitam sebesar 0,5 g/kgBB/hari yang diberikan selama 60 hari dapat meningkatkan parameter antioksidan (CAT, SOD, GPx, dan MDA) secara signifikan.<sup>77</sup> Penelitian oleh Abbasnezhad *et al.* menunjukkan dosis ekstrak jintan hitam sebesar 0,4 g/kgBB/hari yang diberikan selama 42 hari dapat menurunkan MDA secara signifikan.<sup>78</sup> Penelitian oleh Kaleem *et al.* menunjukkan dosis ekstrak jintan hitam sebesar 0,3 g/kgBB/hari yang diberikan selama 30 hari dapat meningkatkan parameter antioksidan (CAT, SOD, GPx, GSH) dan menurunkan MDA secara signifikan.<sup>79</sup>

Penelitian Tavakkoli *et al.*, yang bertujuan untuk mengetahui dosis toksik akut ekstrak jintan hitam menunjukkan bahwa pemberian ekstrak jintan hitam sebanyak 3 g/kgBB masih belum menunjukkan efek toksik.<sup>56</sup> Disimpulkan bahwa rentang dosis antara 0,3–0,81 g/kgBB/hari dalam rentang waktu terapi antara 25-60 hari menunjukkan efek terapeutik yang signifikan.<sup>56</sup>

Penanda inflamasi seperti IL-6 dan CRP berpengaruh terhadap penurunan NO dan peningkatan ET-1 sehingga menyebabkan disfungsi endotel pada aterosklerosis.<sup>28</sup> Studi oleh Gholamnezhad menunjukkan bahwa pemberian jangka panjang jintan hitam dapat mengubah profil sitokin pro dan antiinflamasi yaitu peningkatan IL-6, TNF $\alpha$  dan IL-10 serta penurunan IL-4.<sup>80</sup>

Paparan asap rokok memengaruhi perkembangan pembuluh darah baru atau yang disebut dengan angiogenesis. Angiogenesis membutuhkan aktivasi sel-sel endotel oleh sitokin angiogenik yang diikuti proliferasi dan migrasi sel endotel. Nikotin menginduksi perluasan dan pelepasan faktor angiogenik, termasuk NO, prostasiklin, VEGF, dan bFGF pada endotel. Perokok memiliki gangguan kemampuan regenerasi endotel. Sel endotel diregenerasi sebagian dari sel progenitor endotel di sirkulasi yang berasal dari sumsum tulang.<sup>25</sup> Penelitian Al Asoom menunjukkan bahwa jintan hitam menginduksi pertumbuhan kapiler dengan didapatkan

adanya peningkatan *VEGF* yang signifikan namun tidak sampai memicu penebalan dinding arteri.<sup>81</sup>

*Thymoquinone* pada jintan hitam juga terbukti dapat menurunkan jumlah trombosit dan protrombin pada agregasi platelet.<sup>53</sup> Studi tentang pemberian minyak jintan hitam pada tikus selama 12 minggu dengan dosis harian 2 mg/kg berat badan menyebabkan penurunan jumlah trombosit dan agregasinya secara signifikan. Penurunan trombosit ini tidak sampai memicu kondisi patologi pada hewan coba tikus yang ditunjukkan dengan tidak adanya perubahan histopatologi organ seperti jantung, hepar, ginjal dan pankreas.<sup>67</sup>

Jintan hitam mempunyai efek kardiovaskular berupa efek proteksi terhadap disfungsi endotel. Jintan hitam yang diberikan pada hewan coba mampu meningkatkan kadar NO yang juga diikuti penurunan faktor angiogenesis berupa *VEGF* serta penurunan ekspresi molekul adhesi pada pembuluh darah berupa *VCAM-1* dan *PECAM-1*. Pemberian jintan hitam juga dapat menurunkan kadar faktor koagulasi von Willebrand. Efek jintan hitam terhadap parameter disfungsi endotel diduga merupakan efek tidak langsung melalui jalur antioksidan. Penelitian tersebut juga menunjukkan bahwa penurunan parameter di atas terjadi hingga ke tingkat ekspresi gen sehingga dapat disimpulkan bahwa jintan hitam juga secara langsung menurunkan parameter tersebut tanpa melalui jalur antioksidan.<sup>78,81</sup>

Pada sebuah penelitian yang dilakukan oleh penulis, ekstrak etanol jintan hitam dapat menghambat disfungsi endotel tikus yang dipaparkan asap rokok dalam berbagai dosis. Hal ini selain melalui mekanisme peningkatan kadar NO dan penurunan faktor-faktor angiogenesis dan ekspresi molekul adhesi, juga dikaitkan melalui penghambatan peningkatan rasio makrofag M1/M2. Sebanyak 50 tikus wistar yang telah dipaparkan dengan asap 40 rokok tiap hari dialokasikan secara acak pada 5 grup eksperimen: grup kontrol negatif, grup kontrol positif, grup perlakuan dengan dosis 0,3 g, grup perlakuan dengan dosis 0,6 g, dan grup perlakuan dengan dosis 1,2 g. Setelah 28 hari paparan asap rokok, rasio makrofag M1/M2 pada kelompok kontrol positif adalah  $4,97 \pm 3,42$  ( $> 1$ ), hingga terdapat dominasi makrofag M1. Tidak didapatkan perbedaan signifikan pada hitung jumlah M1 pada kelompok perlakuan 1, 2, dan 3

(dengan nilai  $p = 0,996; 0,170; 0,884$ , secara berurutan) jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Selain itu, kelompok perlakuan 2 memiliki jumlah M1 yang lebih rendah dengan nilai signifikansi tertinggi dibanding kontrol. Hal ini membuktikan bahwa ekstrak etanol jantan hitam dapat menghambat disfungsi endotel akibat paparan asap rokok melalui penghambatan peningkatan rasio makrofag M1/M2.<sup>82</sup>

Makrofag merupakan salah satu sel imun yang berkaitan erat dengan proses inflamasi akibat berbagai sebab. Makrofag dapat berpolarisasi menjadi sub tipe M1 yang bersifat proinflamasi atau M2 yang bersifat antiinflamasi, bergantung pada sinyal yang diterima. Dari berbagai macam stimuli yang dapat memengaruhi aktivitas makrofag, asap rokok merupakan salah satu stimuli yang paling dominan karena efek prooksidannya. Aktivasi dan polarisasi makrofag merupakan salah satu mekanisme sentral munculnya disfungsi endotel yang kemudian akan menjadi aterosklerosis akibat paparan asap rokok.<sup>82</sup>

Penelitian menunjukkan bahwa paparan asap rokok meningkatkan makrofag M1 dengan marka *CD38* dan makrofag M2 dengan marka *Egr-2* secara signifikan, dengan rasio M1/M2 dominan pada M1. Penelitian oleh Eapen *et al.* mendapati adanya peningkatan akumulasi makrofag M1 dan penurunan ekspresi M2 pada alveoli pasien *Chronic Obstructive Pulmonary Disease* (COPD) dengan riwayat merokok.<sup>82</sup> Namun studi lain oleh Dewhurst *et al.* menunjukkan hasil yang berbeda ketika makrofag M2 lebih dominan pada alveoli perokok.<sup>82</sup>

Hasil berbeda tersebut dapat dijelaskan melalui penelitian oleh Yuan *et al.* yang meneliti ekspresi makrofag M1 dan M2 pada mencit dengan pemberian ekstrak asap rokok dengan waktu paparan dan konsentrasi rokok yang berbeda.<sup>82</sup> Mencit kontrol tanpa pemberian ekstrak asap rokok menunjukkan ekspresi makrofag basal ketika M1 lebih dominan dibandingkan dengan M2. Pemberian ekstrak asap rokok 2% selama 2 hari belum menunjukkan adanya polarisasi makrofag, saat M1 masih lebih dominan dibandingkan M2. Pada hari ke-6, M2 beserta ekspresi sitokinnya (*IL-10*, *IL-6*, *TGF- $\beta$ 1* and *TGF- $\beta$ 2*) lebih dominan dibandingkan M1 beserta ekspresi sitokinnya (*TNF- $\alpha$*  dan *IL-12p40*). Hal tersebut menunjukkan bahwa polarisasi makrofag terjadi seiring dengan lamanya paparan asap

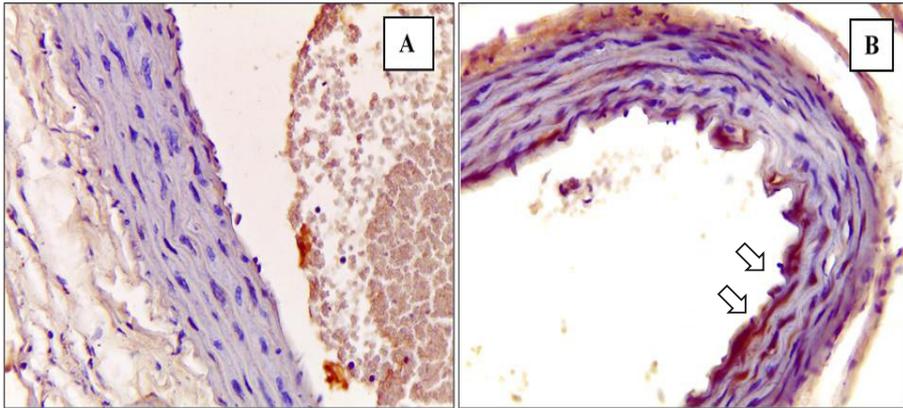
rokok. Yuan *et al.*, juga menemukan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak asap rokok namun dengan lama paparan yang sama, polarisasi ke arah M2 akan semakin meningkat.<sup>82</sup>

Penelitian oleh Chen *et al.* juga menunjukkan bahwa aktivasi M1 banyak terjadi ketika memasuki fase inflamasi awal akibat paparan asap rokok dan penurunan aktivasi M1 terjadi ketika telah memasuki fase patologis lebih lanjut.<sup>90</sup> Sampai saat ini belum ada penelitian yang meneliti hubungan paparan asap rokok dengan jumlah rokok dan lama paparan yang sesuai dengan penelitian ini. Sehingga penelitian ini menemukan suatu kebaruan bahwa paparan asap rokok 40 batang per hari selama 28 hari meningkatkan M1 secara signifikan dan M2 secara signifikan dengan hasil perhitungan rasio M1/M2 dominan pada M1.<sup>82</sup>

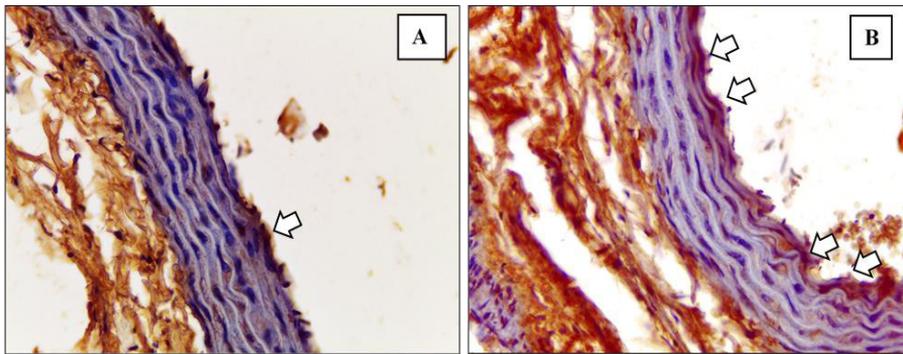
Polarisasi makrofag akibat paparan asap rokok dapat melalui tiga mekanisme yang berbeda yaitu melalui jalur *NF-κB*, *Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)*, dan *Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK/STAT)*. Jalur-jalur ini merupakan jalur utama untuk produksi berbagai macam sitokin yang memengaruhi makrofag. Aktivasi jalur-jalur ini juga sangat dipengaruhi oleh dosis dan kandungan rokok yang digunakan.

Kandungan hidrokuinon pada asap rokok dengan dosis tertentu diketahui dapat menghambat aktivasi *NF-κB* yang kemudian menurunkan produksi sitokin proinflamasi seperti *TNF-α*, *IL-1β*, *IL-6*, *IL-8*, *TLR2* and *TLR4* sehingga memicu polarisasi makrofag ke arah fenotip M2. Namun dosis rendah pada asap rokok memiliki efek yang berkebalikan. Asap rokok juga dapat memengaruhi sinyal *MAPK* melalui kandungan akroleinnya. Paparan asap rokok selama 4 bulan dapat menghambat aktivasi *MAPK* dan menurunkan sitokin proinflamasi *TNF-α* dan *IL-12* sehingga makrofag M2 lebih banyak ditemukan.<sup>18</sup> Paparan asap rokok yang cenderung lebih singkat memiliki efek yang berkebalikan yaitu adanya aktivasi *MAPK* sehingga meningkatkan produksi sitokin proinflamasi *TNF-α* dan *IL-8*.<sup>45</sup> Jalur ketiga yang terpengaruh oleh paparan asap rokok adalah sinyal *JAK/STAT*. Kandungan asap rokok diketahui dapat memfosforilasi protein *JAK* yang kemudian disusul dengan aktivasi beberapa protein *STAT*. Secara umum, kandungan asap rokok yang meningkatkan aktivasi *STAT3* dan

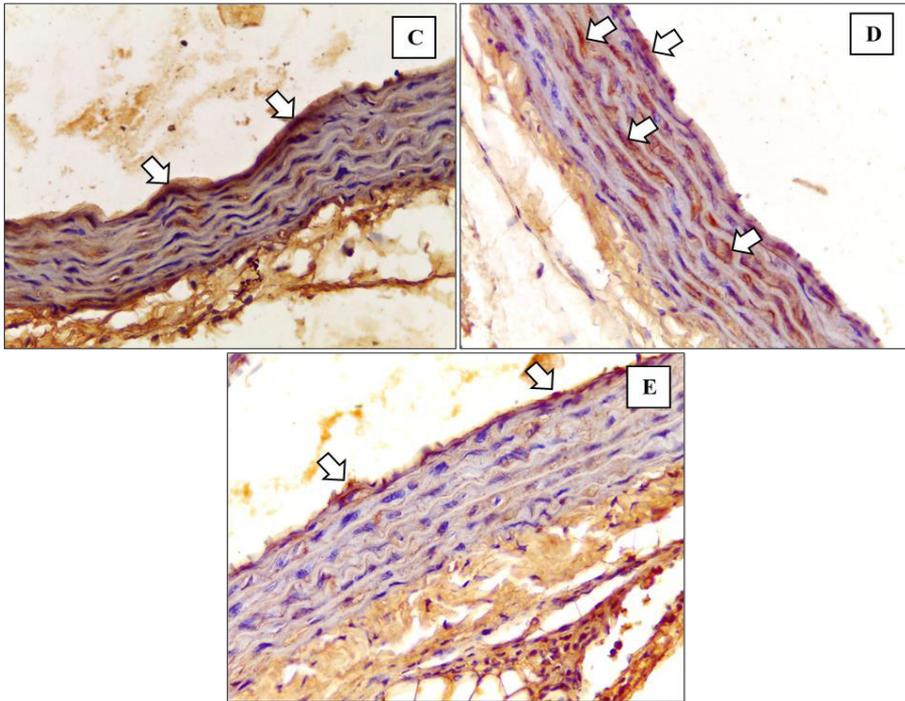
*STAT6* akan menurunkan sitokin proinflamasi dan meningkatkan sitokin antiinflamasi seperti *IL-12*, *IL-10*, *IL-6* dan *TGF-β* sehingga berhubungan dengan makrofag M2. Sementara penurunan aktivasi *STAT1* berhubungan peningkatan makrofag M1. Sampai saat ini, belum ada penelitian yang melihat pengaruh komponen asap rokok tertentu yang secara dominan memengaruhi jalur *JAK/STAT*.



**GAMBAR 14.** Hasil pengamatan ekspresi M1 dengan marka CD38 (panah putih) pada (A) Kontrol negatif (B) Kontrol positif.<sup>82</sup>



**GAMBAR 15.** Hasil pengamatan ekspresi M2 dengan marka *Egr-2* (panah putih) pada (A) Kontrol negatif (B) Kontrol positif.<sup>82</sup>



**GAMBAR 16.** Hasil pengamatan ekspresi M2 dengan marka Egr-2 (panah putih) pada (C) Perlakuan 1 (D) Perlakuan 2 (E) Perlakuan 3.<sup>62</sup>

# 04

## Pemberian Jintan Hitam pada Pembuluh Darah Tikus yang Terpapar Asap Rokok



Untuk mengetahui pengaruh pemberian jintan hitam pada pembuluh darah yang telah terpapar asap rokok, dapat dilakukan sebuah penelitian *true experimental* yang menggunakan hewan coba tikus sebagai objek penelitian. Perlakuan yang diberikan adalah dengan memberikan ekstrak etanol jintan hitam (*Nigella sativa*) pada tikus yang diberi paparan asap rokok. Parameter yang dilihat, sesuai dengan tinjauan pustaka, adalah kadar eNOS dan VCAM-1 sebagai marka disfungsi endotel pada pembuluh darah objek penelitian.<sup>83</sup>

## 1. EKSTRAKSI JINTAN HITAM DAN PENENTUAN DOSIS TERAPI

Berbagai studi telah mengemukakan cara ekstraksi jintan hitam (*Nigella sativa*), antara lain metode-metode pada studi oleh Al-Saleh *et al.* pada tahun 2006, Hadad *et al.*, Velho-Pereira *et al.*, dan Koshak *et al.*<sup>79,83,84,85</sup> Biji jintan hitam dihaluskan kemudian diekstraksi dengan pelarut etanol menggunakan metode maserasi dengan pengadukan konstan dengan kecepatan 1.200 rpm selama 24 jam. Hasil campuran disaring dan kemudian dilakukan pengadukan diulang. Langkah tersebut diulang hingga hari ke-6. Hasil campuran pada hari ke-6 kemudian disaring dan dievaporasi menggunakan rotaevaporator hingga volume konstan. Kandungan *thymoquinone* pada jintan hitam hasil ekstraksi tersebut dicek kadarnya dengan metode *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Supernatan hasil sentrifugasi sebanyak 20 uL disuntikkan ke mesin HPLC pada fase gerak air-etanol (25 + 75, v/v) dengan aliran laju 1 mL/menit. Kuantifikasi dicapai dengan deteksi UV pada 254 nm, berdasarkan daerah puncak. Kalibrasi kurva daerah puncak untuk *thymoquinone* adalah pada konsentrasi 0,5, 1, 2,5, 5, 10 dan 20 ppm.<sup>84,85</sup>

Pemberian ekstrak jintan hitam menggunakan metode di atas memiliki efek yang berbeda-beda tergantung dosis yang diberikan kepada hewan coba. Marwan *et al.* menggunakan dosis ekstrak jintan hitam sebesar 1,2 g/kgBB/hari selama 90 hari, dapat meningkatkan GSH dan menurunkan kadar MDA.<sup>46</sup> Penelitian oleh Houcher *et al.* menunjukkan dosis ekstrak jintan hitam sebesar 0,81 g/kgBB/hari yang diberikan selama 25 hari dapat meningkatkan status antioksidan total secara signifikan.<sup>76</sup> Penelitian oleh Alsuhaibani menunjukkan dosis ekstrak jintan hitam sebesar 0,5 g/kgBB/hari yang diberikan selama 60 hari dapat meningkatkan parameter antioksidan (CAT, SOD, GPx dan MDA) secara signifikan.<sup>77</sup> Penelitian oleh Abbasnezhad *et al.* menunjukkan dosis ekstrak jintan hitam sebesar 0,2 mg/kg/hari lebih poten dari dosis 0,4 mg/kgBB/hari, yang diberikan selama 42 hari untuk menurunkan MDA secara signifikan pada *hippocampus* tikus diabetes yang diinduksi Streptozotocin.<sup>78</sup> Penelitian oleh Kaleem *et al.* menunjukkan dosis ekstrak jintan hitam sebesar 0,3 g/kgBB/hari yang diberikan selama 30 hari dapat meningkatkan parameter antioksidan (CAT, SOD, GPx, GSH) dan menurunkan MDA secara signifikan pada

tikus diabetes yang diinduksi Streptozotocin.<sup>79</sup> Dosis ekstrak jantan hitam antara 0,3–0,81 g/kgBB/hari dalam rentang waktu terapi antara 25–60 hari disimpulkan memiliki efek terapeutik yang signifikan.

Metode ekstraksi dan jenis pelarut memengaruhi komposisi kandungan ekstrak jantan hitam yang didapat.<sup>47,64</sup> Penelitian Kausar *et al.* berhasil mengidentifikasi bahwa ekstraksi maserasi dengan pelarut metanol jantan hitam India mengandung kadar *thymoquinone* paling tinggi (4,27%) dibandingkan dengan pelarut hexane (3,67%) dan petroleum ether (2,9%) dengan menggunakan metode HPLC.<sup>51</sup> Iqbal *et al.* menunjukkan bahwa *thymoquinone* jantan hitam dari India terdeteksi oleh HPLC dengan komposisi tertinggi pada pelarut benzene kemudian pelarut hexane dan pelarut metanol.<sup>64</sup> Pelarut etanol dan air, kandungan *thymoquinone* sangat minimal. Hasil tersebut menunjukkan bahwa ekstraksi jantan hitam dengan pelarut benzene mengandung kadar *thymoquinone* paling tinggi. Ekstrak jantan hitam dengan hexane mengandung *thymoquinone* lebih tinggi 1,55 kali lipat dan benzene mengandung *thymoquinone* 10 kali lipat jika dibandingkan dengan pelarut metanol. Namun pelarut metanol masih menjadi pilihan untuk digunakan sebagai pelarut ekstraksi berbagai macam sumber antioksidan, mudah didapatkan dan mampu mengeluarkan kadar *thymoquinone* meskipun tidak secara maksimal.<sup>64</sup>

Selain hasil tersebut, Iqbal *et al.* juga menemukan hasil lain yang menarik yaitu kadar *thymoquinone* ekstrak jantan hitam pada berbagai pelarut tersebut berkorelasi positif lemah terhadap aktivitas antioksidannya.<sup>64</sup> Aktivitas antioksidan tertinggi justru didapatkan pada ekstrak jantan hitam dengan pelarut air dan terendah pada pelarut metanol jika dibandingkan dengan standar *thymoquinone*. Meskipun ekstrak jantan hitam dengan pelarut air kandungan *thymoquinone* dapat diabaikan namun aktivitas antioksidan totalnya didapatkan paling tinggi, sehingga keberadaan senyawa bioaktif lainnya yang memiliki potensi antioksidan tidak dapat dikesampingkan.

Meskipun ekstrak jantan hitam dengan pelarut metanol terbukti mengandung kadar *thymoquinone* yang tinggi dibandingkan pelarut yang lain, perlu diperhatikan bahwa metanol tidak selalu dapat digunakan sebagai pelarut ekstrak jantan hitam dalam penelitian. Hal tersebut

dikarenakan metanol memiliki efek toksisitas yang tinggi jika diberikan kepada hewan coba. Pelarut metanol memiliki efek toksisitas akut yang signifikan lebih tinggi dibandingkan dengan etanol. Etanol memiliki nilai LD50 sebesar 22,5 ml/kgBB sedangkan metanol sebesar 13 ml/kgBB.<sup>69</sup> Hal tersebut yang mendasari penelitian ini untuk menggunakan etanol sebagai pelarut ekstrak jintan hitam. Selain etanol memiliki efek toksisitas akut yang lebih rendah, etanol juga dapat mengeluarkan kandungan *thymoquinone* jintan hitam dengan menggunakan metode ekstraksi maserasi meskipun dengan jumlah minimum (0,4–1,52%) namun tetap memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan pelarut metanol.<sup>64,69,84,85</sup>

Ekstraksi jintan hitam (*Nigella sativa*) diadaptasi dari metode oleh Al-Saleh *et al.* (2006), Hadad *et al.*, Velho-Pereira *et al.*, dan Koshak *et al.*<sup>79,83,84,85</sup> Biji jintan hitam dihaluskan kemudian diekstraksi dengan pelarut etanol menggunakan metode maserasi dengan pengadukan konstan dengan kecepatan 1200 rpm selama 24 jam. Hasil campuran disaring dan kemudian dilakukan pengadukan diulang. Langkah tersebut diulang hingga hari ke-6. Hasil campuran pada hari ke-6 kemudian disaring dan dievaporasi menggunakan rotaevaporator hingga volume konstan. Kandungan *thymoquinone* pada jintan hitam hasil ekstraksi tersebut dicek kadarnya dengan metode *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*. Supernatan hasil sentrifugasi sebanyak 20 uL disuntikkan ke mesin *HPLC* pada fase gerak air-etanol (25 + 75, v/v) dengan aliran laju 1 mL/menit. Kuantifikasi dicapai dengan deteksi *UV* pada 254 nm, berdasarkan daerah puncak. Kalibrasi kurva daerah puncak untuk *thymoquinone* adalah pada konsentrasi 0,5, 1, 2,5, 5, 10 dan 20 ppm.

Pemberian ekstrak jintan hitam menggunakan metode di atas memiliki efek yang berbeda-beda tergantung dosis yang diberikan kepada hewan coba. Marwan *et al.* menggunakan m dosis ekstrak jintan hitam sebesar 1,2 g/kgBB/hari selama 90 hari, dapat meningkatkan GSH dan menurunkan kadar MDA.<sup>46</sup> Penelitian oleh Houcher *et al.* menunjukkan dosis ekstrak jintan hitam sebesar 0,81 g/kgBB/hari yang diberikan selama 25 hari dapat meningkatkan status antioksidan total secara signifikan.<sup>76</sup>

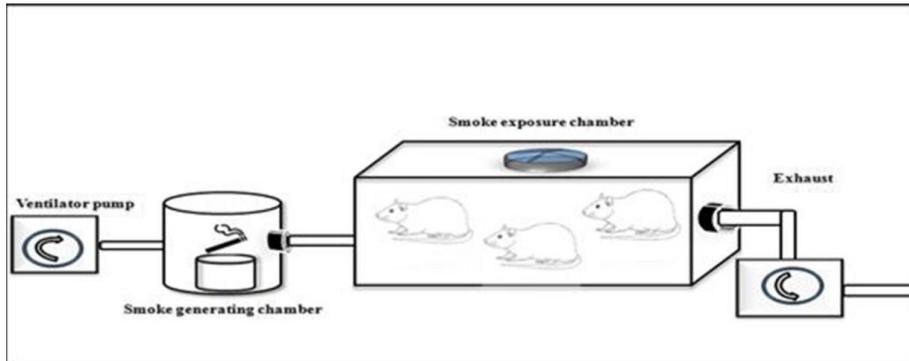
Penelitian oleh Alsuhaibani *et al.* menunjukkan dosis ekstrak jintan hitam sebesar 0,5 g/kgBB/hari yang diberikan selama 60 hari dapat meningkatkan parameter antioksidan (*CAT*, *SOD*, *GPx* dan *MDA*) secara signifikan.<sup>77</sup> Penelitian oleh Abbasnezhad *et al.* menunjukkan dosis ekstrak jintan hitam sebesar 0,2 mg/kg/hari lebih poten dari dosis 0,4 mg/kgBB/hari, yang diberikan selama 42 hari untuk menurunkan *MDA* secara signifikan pada *hippocampus* tikus diabetes yang diinduksi Streptozotocin.<sup>78</sup> Penelitian oleh Kaleem *et al.* menunjukkan dosis ekstrak jintan hitam sebesar 0,3 g/kgBB/hari yang diberikan selama 30 hari dapat meningkatkan parameter antioksidan (*CAT*, *SOD*, *GPx*, *GSH*) dan menurunkan *MDA* secara signifikan pada tikus diabetes yang diinduksi Streptozotocin.

Dosis ekstrak jintan hitam yang dapat digunakan dalam penelitian adalah sebesar 0,3 g/KgBB/hari, 0,6 g/KgBB/hari dan 1,2 g/KBB/hari selama 28 hari selama paparan 4 minggu. Ekstrak jintan hitam diberikan secara oral menggunakan sonde lambung. Dosis masing-masing ekstrak jintan hitam dilarutkan dalam 1 ml *Natrium-Carboxymethyle Cellulose* (Na-CMC). Volume 1 ml Na-CMC tersebut disesuaikan dengan volume normal lambung tikus yaitu 3-5 ml agar tidak terjadi stres atau perobekan dinding lambung tikus.<sup>86</sup>

## 2. PEMAPARAN ASAP ROKOK

Hewan coba perlu diadaptasikan terlebih dahulu terhadap asap rokok selama tujuh hari sebelum diberi perlakuan. Pemaparan asap rokok dilakukan dengan sistem mengekspos tikus ke asap rokok *sidestream* dari pompa peristaltik, ruangan penghasil asap, dan ruang inhalasi terhubung melalui tabung silikon yang dimodifikasi. Pompa ventilator diatur untuk memasok 150 mL udara setiap 10 detik. Ruang penghasil asap terdiri dari sebuah kotak akrilik. Delapan rokok dinyalakan secara bersamaan dan dikirim ke ruang inhalasi berisi 10 ekor tikus kemudian asap diinkubasi di dalam kotak selama 30 menit. Ruang inhalasi terdapat lubang untuk sirkulasi udara berukuran 2,5 cm sebanyak 6 lubang. Rokok kretek tanpa filter dengan kandungan 39 mg tar dan 2,3 mg nikotin yang diperoleh di pasaran digunakan dalam penelitian ini. Dosis rokok yang diberikan

diadaptasi dari penelitian oleh Ali *et al.* dan Jaldin *et al.* yaitu, 40 batang rokok/hari (8 rokok per 1x pemberian, dilakukan 5x sehari).<sup>13</sup> Pemaparan rokok dilakukan setiap hari (280 rokok/minggu) selama 4 minggu (subkronik).



**GAMBAR 17.** Ilustrasi Tindakan Pemberian Asap dalam Ruangan Tertutup pada Tikus.<sup>82</sup>

Pembedahan tikus dilakukan dengan memberikan anestesi terlebih dahulu. Anestesi diberikan per inhalasi dengan kloroform dalam suatu wadah tertutup. Tikus yang sudah diberi anestesi di atas steroform, fiksasi, lalu bedah mulai dari insisi pada bagian toraks. Setelah itu, ambil darah melalui ventrikel jantung hingga 5 cc kemudian ambil organ jantung dan aorta dan fiksasi ke dalam formalin 10%. Tikus yang sudah diambil organnya kemudian dimusnahkan dan dikubur.

### 3. PEMERIKSAAN KADAR ENDHOTELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE (ENOS) JARINGAN AORTA

Pemeriksaan kadar eNOS dilakukan menggunakan metode *Sandwich* ELISA. Kit eNOS menggunakan *elabscience* no. katalog E-EL-R0367. Satuan eNOS adalah ng/ml dan telah distandarisasi dari *National Institute for*

*Biological Standards and Controls*, Blanche Lane, South Mimms, Potters Bars, Hertfordshire, UK.

Sampel berupa jaringan aorta, alat, bahan dan preparasi standar dipersiapkan. Jaringan aorta dihomogenisasi menjadi larutan sampel. 100 uL larutan sampel dimasukkan pada *well coated primary antibody anti-eNOS*, tutup *well* dan diinkubasikan *overnight* pada suhu 4 °C dengan mesin *shaking*. Larutan dari *well* dibuang menggunakan *wash solution* 400 uL dan pencucian diulang sebanyak 4 kali, kemudian dikeringkan menggunakan *clean paper towel*. Antibodi sekunder *anti-eNOS* sebesar 100 uL ditambahkan pada setiap *well*, kemudian diinkubasikan selama 2 jam pada suhu ruang dengan mesin *shaking*. Larutan cuci dibuang menggunakan *wash solution* sama dengan langkah pencucian di atas. *Substrate* dengan volume 100 uL ditambahkan pada tiap *well*, kemudian diinkubasikan selama 30 menit pada suhu ruang, hindarkan dari cahaya langsung. 50 uL *stop solution* ditambahkan pada tiap *well*, kemudian segera baca pada panjang gelombang 450 nm.

#### **4. PEMERIKSAAN VASCULAR ADHESION MOLECULE 1 (VCAM-1) JARINGAN AORTA**

Pewarnaan imunohistokimia dengan metode *streptavidin-biotin complex* (PBS) untuk menentukan ekspresi VCAM-1 pada aorta tikus. Jaringan aorta tikus difiksasi pada kaca objek dan dilakukan deparafinisasi. Rehidrasi dengan alkohol, kemudian dicuci dengan PBS dan direndam pada 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selama 20 menit. Penambahan 1% *bovine serum albumin* (SA) dalam PBS dan diinkubasi selama 30 menit di suhu ruang. Antibodi Primer (*Anti-VCAM-1*) (*Santacruz biotech* SC-13160) ditambahkan dan dinkubasi selama 30 menit, lalu cuci menggunakan PBS. Antibodi sekunder berlabel biotin (*Anti Rat IgG Biotin Labelled*), diinkubasi selama 10 menit di suhu ruang, lalu cuci menggunakan PBS. *Streptavidin-Horse Radish Peroxidase* (SA-HRP) ditambahkan dan diinkubasi selama 10 menit di suhu ruang kemudian cuci menggunakan PBS. *Chromogen* DAB (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride) ditambahkan kemudian diinkubasi selama 10 menit di suhu ruang kemudian cuci menggunakan PBS dan air steril. Langkah

terakhir adalah penambahan *counterstain* (*Hematoxylin Eosin*) selama 1 menit kemudian preparat ditutup *cover glass* dan diperiksa di bawah mikroskop. Pembacaan ekspresi VCAM- 1 pada aorta dilakukan dengan pembesaran 400X dengan menggunakan mikroskop. Ekspresi VCAM-1 diukur pada 10 lapang pandang pada tunika intima dan media jaringan aorta. Ekspresi VCAM-1 dihitung dengan skor *Immunoreactivity Scoring System* (IRS) dengan menghitung skor persentase sel yang positif dikali intensitas pewarnaan.

**TABEL 2.** *immunoreactivity scoring system* (IRS).<sup>89</sup>

Skor persentase sel positif	Skor intensitas pewarnaan
0 = tidak ada sel yang positif	0 = tidak ada reaksi warna
1 = <10% sel yang positif	1 = intensitas warna lemah
2 = 10-50% sel yang positif	2 = intensitas warna sedang
3 = 51-80% sel yang positif	3 = intensitas warna kuat
4 = > 80% sel yang positif	

## 5. PENGARUH PAPARAN ASAP ROKOK DAN PEMBERIAN EKSTRAK JINTAN HITAM PADA PEMBULUH DARAH

### a. Pengaruh Paparan Asap Rokok terhadap Kadar eNOS

Pemeriksaan kadar eNOS dilakukan menggunakan metode *Sandwich* ELISA. Kit eNOS menggunakan *elabscience* No. katalog E-EL-R0367. Satuan eNOS adalah ng/ml dan telah distandarisasi dari *National Institute for Biological Standards and Controls*, Blanche Lane, South Mimms, Potters Bars, Hertfordshire, UK.

Sampel berupa jaringan aorta, alat, bahan dan preparasi standar dipersiapkan. Jaringan aorta dihomogenisasi menjadi larutan sampel. 100 uL larutan sampel dimasukkan pada *well coated primary antibody anti-eNOS*, tutup *well* dan diinkubasikan *overnight* pada suhu 4°C dengan mesin *shaking*. Larutan dari *well* dibuang menggunakan *wash solution* 400 uL dan pencucian diulang sebanyak 4x, kemudian dikeringkan menggunakan

*clean paper towel*. Antibodi sekunder *anti-eNOS* sebesar 100 uL ditambahkan pada setiap *well*, kemudian diinkubasikan selama 2 jam pada suhu ruang dengan mesin *shaking*. Larutan cuci dibuang menggunakan *wash solution* sama dengan langkah pencucian di atas. *Substrate* dengan volume 100 uL ditambahkan pada tiap *well*, kemudian diinkubasikan selama 30 menit pada suhu ruang, hindarkan dari cahaya langsung. 50 uL *stop solution* ditambahkan pada tiap *well*, kemudian segera baca pada panjang gelombang 450 nm.

Penurunan bioavailabilitas NO adalah mekanisme sentral dalam patofisiologi disfungsi endotel. *Endothelial Nitric Oxide Synthetase* (eNOS) adalah enzim yang menghasilkan NO dalam sel endotel, sehingga tingkat eNOS dapat mewakili bioavailabilitas NO dalam sel endotel. Penelitian ini menunjukkan bahwa paparan asap rokok dapat menurunkan kadar eNOS pada aorta. Hasil ini konsisten dengan temuan penelitian sebelumnya yang menunjukkan penurunan eNOS pada kultur sel endotel yang dipapar asap rokok. Sebelumnya, telah ditunjukkan bahwa paparan ekstrak asap rokok pada kultur sel endotel progenitor dapat menurunkan ekspresi gen dan protein eNOS serta mengakibatkan disfungsi sel yang ditandai dengan berkurangnya kemampuan sel untuk proliferasi, adhesi dan migrasi. Sementara itu, penelitian lain membuktikan bahwa pemberian ekstrak asap rokok dapat menurunkan ekspresi gen dan protein dari eNOS. Efek penurunan eNOS ini bergantung pada lamanya waktu inkubasi ekstrak asap rokok pada sel. Semakin lama inkubasi ekstrak asap rokok maka kadar eNOS akan semakin menurun. Selain penurunan eNOS pada tingkat berupa m-RNA eNOS, Penelitian lain juga menunjukkan bahwa paparan asap rokok juga terbukti menurunkan eNOS pada tingkat protein. Kadar eNOS menurun jumlahnya pada aorta marmut yang dipapar rokok selama 8 minggu.

Penurunan eNOS dapat disebabkan oleh radikal bebas dalam asap rokok. Radikal bebas  $O^2$  dapat bereaksi dengan NO untuk membentuk peroksinitrit yang sangat reaktif dan juga memiliki sifat prooksidan. Proses ini membuat NO tidak lagi tersedia sebagai bentuk aktif. Peroksinitrit dan radikal bebas lainnya dapat menonaktifkan BH4 yang merupakan kofaktor penting dalam produksi eNOS. Hal ini dijelaskan oleh penelitian yang

menunjukkan bahwa paparan asap rokok terbukti menurunkan kofaktor BH4 yang berkorelasi negatif dengan jumlah superoksida dan berkorelasi positif dengan produksi NO pada kultur sel endotel. Penurunan kofaktor BH4 menyebabkan terbentuknya eNOS uncoupled sehingga produksi NO akan menurun, Penurunan NO akan menyebabkan disfungsi endotel yang ditandai dengan gangguan tonus pembuluh darah, peningkatan ekspresi molekul adhesi sehingga dapat memicu koagulasi dan inflamasi.<sup>21</sup>

Pada penelitian yang telah dilakukan oleh penulis, kadar eNOS pada aorta tikus yang terpapar asap rokok, diukur menggunakan metode ELISA dan hasil pengukurannya menggunakan satuan pg/mL, menunjukkan nilai  $p=0,000$  pada hasil uji *Independent t-test*, yang menandakan adanya perbedaan yang bermakna antar-kelompok kontrol dan perlakuan.

#### **b. Kadar eNOS setelah Pemberian Ekstrak Jintan Hitam**

Sejumlah penelitian, termasuk di dalamnya penelitian yang dilakukan oleh penulis, menunjukkan adanya peningkatan kadar eNOS setelah pemberian ekstrak jintan hitam. Penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa pemberian ekstrak jintan hitam dengan dosis 0,5–1,5 gram selama 5 hari pada mencit dengan model preeklamsia dapat meningkatkan kadar eNOS vaskular ginjal secara signifikan. Penelitian Hidayati *et al.*, menunjukkan bahwa pemberian ekstrak jintan hitam dapat meningkatkan kadar eNOS jaringan aorta tikus yang dipapar radikal bebas 7,12, *Dimethylbenzantracene* (DMBA).<sup>55</sup> Penelitian Abbasnezhad *et al.* menunjukkan bahwa pemberian ekstrak jintan hitam selama 6 minggu dapat meningkatkan ekspresi gen eNOS pada sel endotel jaringan aorta tikus wistar.<sup>78</sup>

Peningkatan kadar eNOS diduga akibat kandungan aktif dari ekstrak jintan hitam yaitu *thymoquinone*. *Thymoquinone* pada jintan hitam telah diketahui memiliki efek antioksidan sebagai *radical scavenging* yang kuat pada berbagai produk radikal bebas termasuk peroksinitrit. Peroksinitrit merupakan penyebab utama berkurangnya ketersediaan hayati NO dan kofaktor BH4 pada pembuluh darah yang kemudian akan memengaruhi kadar dan aktivitas eNOS serta pembentukan *eNOS uncoupled*.<sup>10</sup> Dengan pengurangan radikal bebas oleh aktivitas *radical scavenging* dari

*thymoquinone*, diharapkan tidak terjadi gangguan aktivitas eNOS dalam pembentukan NO pada endotel pembuluh darah yang selanjutnya menghambat terjadinya disfungsi endotel akibat paparan asap.

Pemberian jintan hitam terbukti dapat meningkatkan kadar eNOS. Penurunan kofaktor BH4 akibat radikal bebas asap rokok dapat dicegah dengan pemberian antioksidan. Pemberian jintan hitam yang memiliki sifat antioksidan yang kuat diduga dapat mengurangi jumlah kerusakan kofaktor BH4 akibat radikal bebas superoksida dan peroksinitrit sehingga *eNOS uncoupled* tidak terjadi.

Pada antioksidan lain seperti asam askorbat diketahui dapat meningkatkan produksi dan stabilitas dari kofaktor BH4. Pada penelitian sebelumnya, asam askorbat (1  $\mu$ M hingga 1 mM, 24 jam) dalam konsentrasi dan kejenuhan 100  $\mu$ M yang relevan secara fisiologis, menyebabkan peningkatan hingga 3 kali lipat kadar kofaktor BH4 dengan cara menstabilkan kadar kofaktor BH4 intraseluler sel HUVEC, sehingga memberikan kondisi reaksi yang optimal untuk sintesis NO dan mencegah disfungsi endotel. Penelitian lain, disimpulkan bahwa asam askorbat intraseluler dalam sel PAEC meningkatkan bioaktivitas eNOS hingga 70%, dengan meningkatkan kadar BH4 intraseluler.<sup>39</sup> Namun sampai saat ini masih belum ada studi yang mempelajari pengaruh pemberian jintan hitam sebagai antioksidan dalam penghambatan penurunan kofaktor BH4, sehingga penelitian perlu dilakukan penelitian lebih lanjut di masa mendatang.

Efek peningkatan eNOS akibat pemberian jintan hitam juga dipengaruhi oleh dosis yang diberikan. Penelitian ini menunjukkan bahwa eNOS meningkat paling signifikan pada kelompok P1 kemudian kadarnya menurun pada kelompok P2 dan P3. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan eNOS paling efektif terjadi pada pemberian ekstrak jintan hitam dengan dosis rendah (0,3 g/kgBB) dan efektivitasnya semakin berkurang dengan dosis yang lebih tinggi (0,6 g/kgBB dan 1,2 g/kgBB). Penelitian lain juga menunjukkan hal serupa yaitu ekstrak jintan hitam pada mencit model preeklamsia dengan dosis 0,5–1,5 gram dapat meningkatkan kadar eNOS secara signifikan, namun kadar eNOS justru menurun pada dosis 2 gram.

Penurunan eNOS pada dosis tinggi jantan hitam diduga disebabkan karena kandungan *thymoquinone*. Telah dibahas sebelumnya bahwa *thymoquinone* memiliki efek antioksidan pada dosis rendah dan sebaliknya, *thymoquinone* dosis tinggi dapat mempunyai efek prooksidan. Hal tersebut dapat terjadi karena *thymoquinone* dapat mengalami siklus reduksi oksidasi menjadi *semiquinone* dan menghasilkan superoksida. Peningkatan superoksida dapat menyebabkan kerusakan kofaktor BH4 sehingga eNOS tidak dapat terbentuk.

### c. Ekspresi VCAM-1

Pewarnaan imunohistokimia dengan metode *streptavidin-biotin complex* untuk menentukan ekspresi VCAM-1 pada aorta tikus. Jaringan aorta tikus difiksasi pada objek glass dan dilakukan deparafinisasi. Rehidrasi dengan alkohol, kemudian dicuci dengan PBS dan direndam pada 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selama 20 menit. Penambahan 1% *Bovine Serum Albumin (BSA)* dalam PBS dan diinkubasi selama 30 menit di suhu ruang. Antibodi Primer (*Anti-VCAM-1*) (*Santacruz biotech SC-13160*) ditambahkan dan diinkubasi selama 30 menit, lalu cuci menggunakan PBS. Antibodi sekunder berlabel biotin (*Anti Rat IgG Biotin Labelled*), diinkubasi selama 10 menit di suhu ruang, lalu cuci menggunakan PBS. *Streptavidin-Horse Radish Peroxidase (SA-HRP)* ditambahkan dan diinkubasi selama 10 menit di suhu ruang kemudian cuci menggunakan PBS. *Chromogen DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)* ditambahkan kemudian diinkubasi selama 10 menit di suhu ruang kemudian cuci menggunakan PBS dan air steril. Langkah terakhir adalah penambahan *counterstain (Hematoxylin Eosin)* selama 1 menit kemudian preparat ditutup *cover glass* dan diperiksa di bawah mikroskop. Pembacaan ekspresi VCAM-1 pada aorta dilakukan dengan pembesaran 400X dengan menggunakan mikroskop. Ekspresi VCAM-1 diukur pada 10 lapang pandang pada tunika intima dan media jaringan aorta. Ekspresi VCAM-1 dihitung dengan skor *Immunoreactivity Scoring System (IRS)* dengan menghitung skor persentase sel yang positif dikali intensitas pewarnaan.

**TABEL 3.** *immunoreactivity scoring system (IRS).*<sup>89</sup>

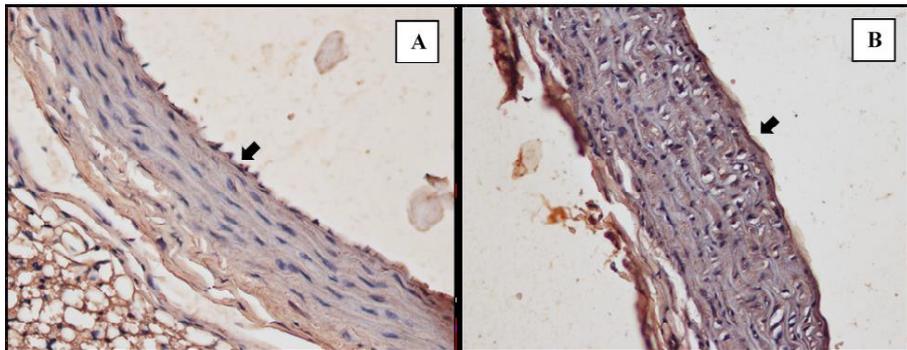
Skor persentase sel yang positif	Skor intensitas pewarnaan
0 = tidak ada sel yang positif	0 = tidak ada reaksi warna
1 = <10% sel yang positif	1 = intensitas warna lemah
2 = 10–50% sel yang positif	2 = intensitas warna sedang
3 = 51–80% sel yang positif	3 = intensitas warna kuat
4 = >80% sel yang positif	

Perekrutan sel-sel inflamasi pada endotel merupakan salah satu proses awal terbentuknya aterosklerosis. Proses perekrutan sel-sel inflamasi ditandai dengan peningkatan ekspresi dari molekul adhesi pada sel endotel, yang salah satunya adalah VCAM-1. VCAM-1 telah diketahui dapat memfasilitasi adhesi sel-sel yang mengekspresikan integrin  $\alpha 4\beta 1$  seperti monosit dan limfosit. Proses stres oksidatif dapat menyebabkan disfungsi endotel pembuluh darah yang ditandai dengan peningkatan ekspresi VCAM-1.<sup>30</sup> Stres oksidatif akibat paparan asap rokok diharapkan dapat meningkatkan ekspresi VCAM-1. Seperti penelitian Yang *et al.* yang membuktikan adanya peningkatan ekspresi VCAM-1 pada arteri tikus setelah dipapar asap rokok selama 7 hari.<sup>87</sup> Penelitian pada tingkat sel oleh Teasdale *et al.* dan Pott *et al.* juga menunjukkan peningkatan ekspresi VCAM-1 pada kultur sel endotel aorta yang dipapar asap rokok.<sup>88,89</sup>

Proses akhir disfungsi endotel ditandai dengan meningkatnya IMT pembuluh darah. Analisis jalur yang dilakukan pada penelitian ini menunjukkan bahwa mekanisme asap rokok dalam menyebabkan disfungsi endotel adalah dengan cara meningkatkan IMT melalui penurunan eNOS. Pembahasan sebelumnya telah memaparkan bahwa paparan asap rokok dapat menurunkan kadar eNOS. Paparan asap rokok juga menunjukkan korelasi negatif yang signifikan dengan kadar eNOS. Penurunan eNOS pada penelitian ini disebabkan oleh peningkatan radikal bebas yang disebabkan oleh asap rokok. Peningkatan radikal bebas dapat menonaktifkan BH4 yang merupakan kofaktor penting dalam produksi eNOS sehingga kadar eNOS juga akan menurun.<sup>90</sup>

Penurunan eNOS ini dapat berpengaruh langsung terhadap peningkatan IMT yang ditunjukkan dengan adanya korelasi negatif

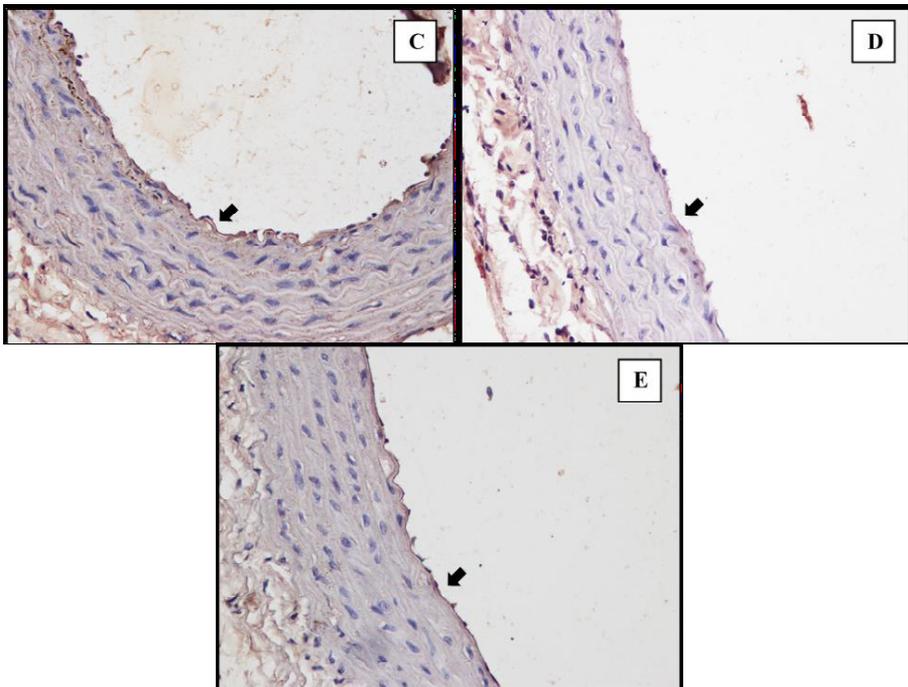
yang signifikan antara kadar eNOS dan IMT. Penurunan kadar eNOS akan diikuti oleh penurunan NO. Penurunan NO akan menyebabkan berbagai macam kondisi patologis pembuluh darah seperti disregulasi tonus pembuluh darah, peningkatan molekul adhesi yang menyebabkan trombosis dan inflamasi serta peningkatan migrasi dan proliferasi dari sel otot polos pembuluh darah. Proses-proses tersebut dapat menyebabkan peningkatan IMT.<sup>90</sup>



**GAMBAR 18.** Hasil pengamatan ekspresi VCAM-1 aorta (panah hitam) pada (A) Kontrol negatif (B) Kontrol positif.<sup>82</sup>

Paparan asap rokok pada penelitian yang dilakukan oleh penulis meningkatkan ekspresi VCAM-1 pada aorta meskipun peningkatannya tidak signifikan secara statistik antara kelompok control dan perlakuan. Peningkatan ekspresi VCAM-1 yang tidak signifikan juga didapatkan pada tingkat penelitian klinis pada manusia. Kadar *soluble* VCAM-1 meningkat pada serum perokok namun tidak signifikan dibandingkan dengan bukan perokok. Peningkatan VCAM-1 diduga berhubungan dengan faktor risiko lain dari aterosklerosis yaitu hiperlipidemia. Mu *et al.* telah membuktikan teori tersebut dengan memeriksa ekspresi VCAM-1 pada jaringan aorta pasien aterosklerosis dengan faktor risiko hiperlipidemia.<sup>90</sup> Hasilnya, ekspresi VCAM-1 berkorelasi positif dengan kadar trigliserida, kolesterol total dan LDL sedangkan VCAM-1 dan HDL memiliki korelasi negatif.<sup>90</sup>

Hal ini dapat menjelaskan hasil dari penelitian yang menunjukkan peningkatan VCAM-1 yang tidak signifikan antara kelompok kontrol dan perlakuan. Karena ekspresi VCAM-1 pada sel endotel membutuhkan pemicu yaitu kadar lipid yang tinggi, terutama LDL. Peningkatan LDL yang teroksidasi di dalam endotel akan difagositosis oleh makrofag. Perekrutan makrofag ini membutuhkan peran dari VCAM-1. Peningkatan VCAM-1 yang tidak bermakna secara statistik ini diperkirakan karena hewan coba penelitian ini bukan hewan coba dengan diet tinggi kolesterol.



**GAMBAR 19.** Hasil pengamatan ekspresi VCAM-1 aorta (panah hitam) pada (C) Perlakuan 1 (dosis 0,3 g/KgBB/hari); (D) Perlakuan 2 (dosis 0,6 g/KgBB/hari); dan (E) (dosis 1,2 g/KgBB/hari).<sup>82</sup>

#### d. Hasil Ekspresi VCAM-1 setelah Pemberian Ekstrak Jintan Hitam

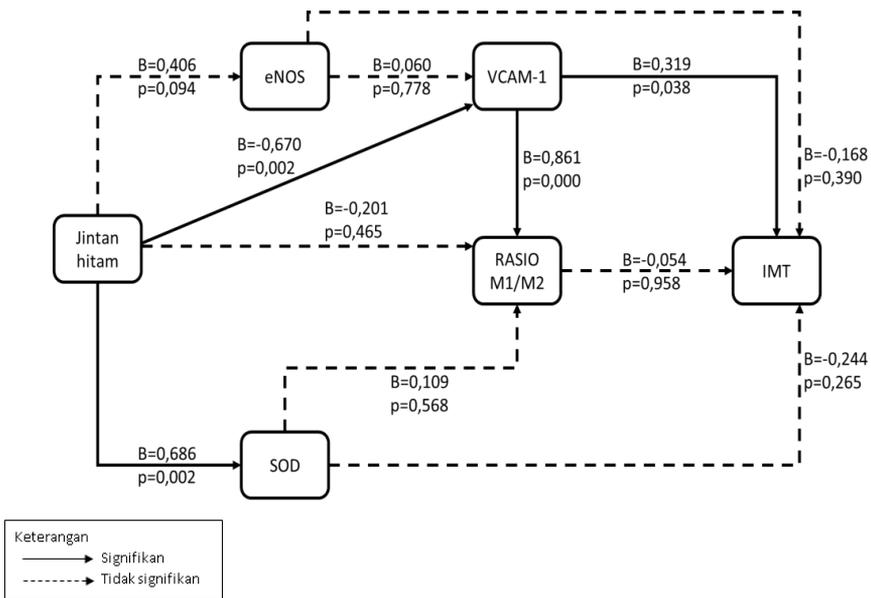
Jintan hitam memiliki kemampuan untuk menurunkan ekspresi VCAM-1 yang telah dibuktikan pada penelitian ini dengan turunnya ekspresi VCAM-1 pada P2 dan P3 secara signifikan. Farhangi et al., juga mendapati penurunan VCAM-1 serum pada pasien dengan tiroiditis Hashimoto's setelah pemberian suplementasi jintan hitam selama 8 minggu.<sup>91</sup> Penelitian ini juga menemukan efek penurunan VCAM-1 juga tidak bergantung pada besaran dosis, yang ditunjukkan dengan tidak adanya perbedaan yang signifikan antara P2 dan P3. Hasil serupa juga telah dipaparkan oleh Abbasnezhad, *et al.* yang menunjukkan bahwa pemberian jintan hitam pada tikus model diabetes selama 6 minggu dapat menurunkan ekspresi gen dari VCAM-1 tanpa bergantung dengan besaran dosis.<sup>78</sup>

Penurunan ekspresi VCAM-1 setelah pemberian jintan hitam diduga berhubungan dengan peningkatan kadar eNOS. Peningkatan kadar eNOS dapat meningkatkan ketersediaan hayati NO. *Nitric oxide* merupakan senyawa penentu dari terjadinya disfungsi endotel, yang salah satu tandanya adalah peningkatan ekspresi VCAM-1. Khan *et al.* melakukan penelitian pada sel endotel umbilikal dan sel endotel mikrovaskular dermal manusia yang dipapar dengan sitokin TNF- $\alpha$  yang kemudian menunjukkan adanya peningkatan ekspresi gen VCAM-1 pada sel tersebut.<sup>92</sup> Pemberian NO pada sel tersebut terbukti dapat mengurangi ekspresi gen VCAM-1 hingga sebesar 65%.<sup>92</sup> Hasil ini tidak berbeda dengan penelitian oleh De Caterina *et al.* yang menunjukkan bahwa NO dapat menurunkan ekspresi gen VCAM-1 pada sel endotel vena saphena manusia yang diinduksi oleh IL-1 $\alpha$  sebesar 35%-55%.<sup>93</sup>

Kedua penelitian diatas juga menjelaskan bahwa peningkatan VCAM-1 berhubungan dengan sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\alpha$ . Penghambatan sitokin tersebut juga dapat menurunkan VCAM-1. Sejalan dengan penelitian oleh Umar *et al.* yang menemukan bahwa kandungan *thymoquinone* pada jintan hitam dapat menurunkan ekspresi VCAM-1 melalui penghambatan pada sitokin proinflamasi TNF- $\alpha$ , IL-6 dan IL-8 melalui jalur *Apoptosis Signal Regulating Kinase 1* (ASK1) pada

sel fibroblast pasien dengan *rheumatoid arthritis*.<sup>94</sup> Jadi, *thymoquinone* pada jintan hitam dapat menurunkan ekspresi VCAM-1 melalui penghambatan sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8 dan peningkatan produksi NO. Hal ini dapat menjelaskan hasil penelitian ini yang menunjukkan bahwa pemberian jintan hitam meningkatkan kadar eNOS yang kemudian dapat meningkatkan produksi NO sehingga ekspresi VCAM-1 menurun.

Hasil imunohistokimia ekspresi VCAM-1 diamati pada tunika intima dan tunika media aorta. Hasil pengamatan kemudian dapat dihitung secara semi-kuantitatif menggunakan satuan *Immunoreactivity Scoring System* (IRS). Pada penelitian yang dilakukan oleh penulis, hasil uji *Kruskal-Wallis* menunjukkan nilai  $p=0,015$  yang menandakan adanya perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan. Hasil analisis *Mann-Whitney* menunjukkan ekspresi VCAM-1 menurun namun tidak signifikan. Penurunan signifikan ekspresi VCAM-1 terjadi pada kelompok yang diberi paparan asap rokok dengan dosis 40 batang per hari dan ekstrak jintan hitam dengan dosis 0,6 g/KgBB/hari.



**GAMBAR 20.** Hasil analisa jalur jintan hitam terhadap variabel penelitian<sup>82</sup>

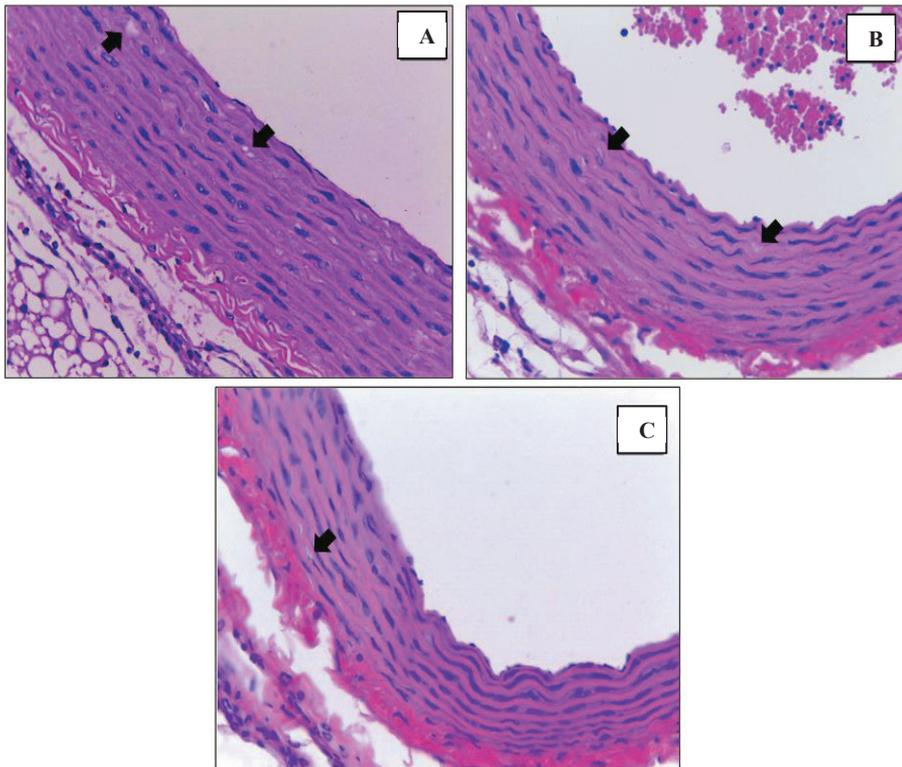
Hasil analisis jalur dari penelitian yang dilakukan oleh penulis, terdapat adanya temuan baru bahwa pemberian jintan hitam dapat menurunkan IMT melalui penurunan VCAM-1.

Paparan asap rokok memengaruhi struktur histologi aorta. Pada penelitian, ditemukan adanya perubahan struktural pada aorta yang ditandai adanya disorganisasi dan vakuolisasi sel otot polos pada tunika media. Tetapi tidak didapatkan perubahan pada tunika intima akibat paparan asap rokok selama empat minggu. Paparan asap rokok selama 4 minggu pada penelitian Ali *et al.* juga menemukan hasil yang sama, yaitu tidak didapatkan perubahan tunika intima pada aorta tikus. Sama halnya pada paparan asap rokok selama 8 minggu, pada penelitian Jaldin *et al.* hanya mendapatkan adanya disorganisasi pada sel otot polos tunika media aorta tikus.<sup>13</sup>

Aorta diambil melalui pembedahan tikus. Pembuatan preparat histopatologi dilakukan dengan metode *paraffin*. Fiksasi dilakukan dengan merendam jaringan aorta tikus dalam formalin 10% selama sehari semalam (24 jam) kemudian dilanjutkan dengan tahap pencucian menggunakan air. Jaringan dimasukkan dalam alkohol 70% selama 1 jam, alkohol 80% selama 1 jam, alkohol 99% selama 1 jam dan alkohol absolut selama 2x1 jam lalu dalam campuran *xylol*: alkohol absolut = 1:1 selama 30 menit, dan *xylol* PA selama 60 menit. Jaringan dipotong setipis mungkin dan dimasukkan ke dalam *melted paraffin*: *xylene* = 1:1 selama 1 jam. *Melted paraffin* dimasukkan ke dalam cetakan berbentuk kubus.

Blok *paraffin* didinginkan dan dikeluarkan dari cetakannya kemudian diletakkan pada alat mikrotom lalu posisi indikator yang menunjukkan ketebalan pemotongan diatur 6–8 mikrometer. Hasil pemotongan saling bersambungan membentuk pita, ujung pita diangkat dengan kuas dan direntangkan di atas permukaan air hangat (30–40° C) secara lembut dan tanpa lipatan. Gelas objek dilapisi dengan gliserol sebagai lapisan tipis dan biarkan kering untuk merekatkan sediaan. Pita *paraffin* tersebut diletakkan di atas gelas objek. Gelas objek diletakkan di atas *steamer* hangat, agar pita mengembang dan lurus tanpa lekukan kemudian dibiarkan kering dan sediaan melekat erat pada gelas objek selama 1 hari. Jaringan yang

berada di gelas objek dimasukkan ke dalam *xylol* selama 3x5 menit, lalu dikeringkan. Hasil diamati pada mikroskop perbesaran 400x.



**GAMBAR 21.** Observasi mikroskopis struktur aorta. Aorta pada kelompok yang diberi ekstrak jintan hitam menunjukkan perbaikan struktur aorta yang ditunjukkan dengan organisasi regular sel otot polos dan penurunan vakuolisasi pada tunika media.<sup>82</sup>

Vakuolisasi adalah salah satu efek dari proses sitotoksik dalam sel dan merupakan tanda awal dari apoptosis sel. Komponen kimia dalam obat-obatan dan polutan dapat menyebabkan stres oksidatif yang ditandai adanya vakuolisasi permanen di dalam sel. Vakuolisasi membuat sel otot polos dalam tunika media memiliki bentuk dan ukuran yang berbeda,

sehingga membuat susunan sel menjadi tidak teratur atau yang disebut dengan disorganisasi.

Peningkatan *IMT* pada pembuluh darah disebabkan adanya kondisi patologis yang menyebabkan banyaknya sel yang mengalami apoptosis dan sebagian sel yang lain akan berproliferasi secara berlebihan sebagai mekanisme kompensasi. Peningkatan *IMT* adalah gambaran dari disfungsi endotel yang merupakan tanda aterosklerosis dini pada paparan asap rokok. Kondisi inilah yang mendasari disfungsi endotel akibat paparan asap rokok pada penelitian ini.

Selain digunakan pada studi praklinis, pengukuran *IMT* juga sering digunakan sebagai parameter evaluasi pada penelitian klinis. Studi suplementasi antioksidan kombinasi vitamin C dan E pada perokok menggunakan *IMT* sebagai parameter evaluasi untuk progresivitas plak aterosklerosis selama tiga tahun. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa pemberian antioksidan dapat menurunkan ketebalan *IMT* hingga 74% jika dibandingkan dengan plasebo.

# 05

## Penutup



Pemberian ekstrak etanol jintan hitam pada tikus Wistar yang terpapar asap terbukti dapat mencegah kerusakan pembuluh darah akibat disfungsi endotel dengan mencegah penurunan kadar enzim *endothelial Nitric Oxide Synthetase* (eNOS) dan mencegah peningkatan ekspresi *Vascular Adhesion Molecule-1* (VCAM-1).

Pemberian jintan hitam terbukti dapat meningkatkan kadar eNOS. Penurunan kofaktor BH4 akibat radikal bebas asap rokok dapat dicegah dengan pemberian antioksidan. Pemberian jintan hitam yang memiliki sifat antioksidan yang kuat diduga dapat mengurangi jumlah kerusakan kofaktor BH4 akibat radikal bebas superoksida dan peroksinitrit sehingga

*eNOS uncoupled* tidak terjadi, dan terjadinya peningkatan kadar eNOS dapat mencegah peningkatan ekspresi *Vascular Adhesion Molecule-1* (VCAM-1).

# Daftar Pustaka



1. WHO global report on trends in prevalence of tobacco smoking [Internet]. Apps.who.int. 2020 [cited 20 November 2020].
2. Aditama T. Smoking problem in Indonesia. Medical Journal of Indonesia. 2002;56.
3. Ahsan A, Wiyono N, Kiting A. Bunga Rampai Fakta Tembakau dan Permasalahannya di Indonesia. 5th ed. Jakarta: Kemkes RI; 2014.
4. Kemkes. Riset Kesehatan Dasar 2013 [Internet]. Jakarta: Kemkes; 2013 [cited 20 November 2020]. Available from: <https://www.kemkes.go.id/resources/download/general/Hasil%20Risesdas%202013.pdf>
5. Kemkes. Potret Sehat Indonesia dari Riskesdas 2018. 1st ed. Jakarta: Kemkes; 2018.

6. Smiljic S. The clinical significance of endocardial endothelial dysfunction. *Medicina*. 2017;53(5):295-302.
7. Nedeljkovic Z. Mechanisms of oxidative stress and vascular dysfunction. *Postgraduate Medical Journal*. 2003;79(930):195-200.
8. de Gaetano M, Crean D, Barry M, Belton O. M1- and M2-Type Macrophage Responses Are Predictive of Adverse Outcomes in Human Atherosclerosis. *Frontiers in Immunology*. 2016;7.
9. Shah P. Pathogenesis of Atherosclerosis. *Essential Cardiology*. 2013:377-386.
10. Münzel T, Gori T, Bruno R, Taddei S. Is oxidative stress a therapeutic target in cardiovascular disease?. *European Heart Journal*. 2010;31(22):2741-2748.
11. Sahak M, Kabir N, Abbas G, Draman S, Hashim N, Hasan Adli D. The Role of *Nigella sativa* and Its Active Constituents in Learning and Memory. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2016;2016:1-6.
12. Al-Turkmani, M., Karabet, F., Mokrani, L., Soukkarieh, C. Chemical composition and in vitro antioxidant activities of essential oil from *Nigella sativa* L. seeds cultivated in Syria. *Int. J. Chem. Tech. Res*. 2015;8(10), 76-82.
13. Sabzghabae A, Dianatkah M, Sarrafzadegan N, Asgary S, Ghannadi A. Clinical Evaluation of *Nigella Sativa* Seeds for the Treatment of Hyperlipidemia: a Randomized, Placebo Controlled Clinical Trial. *Medical Archives*. 2012;66(3):198.
14. Gargari, B.P., Ebrahimzadeh-attary, V., and Rafraf, M. Effect of dietary supplementation with *Nigella sativa* L. on serum lipid profile, lipid peroxidation and antioxidant defense system in hyperlipidemic rabbits. *J. Med. Plant. Res*. 2009; 3(10), 815–821. <https://doi.org/ISSN 1996-0875>
15. Klabunde R. *Cardiovascular Physiology Concept*. 2nd ed. New York: Wolters Kluwer Medical; 2012.
16. Taylor A, Bordoni B. *Histology, Blood Vascular System* [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2020 [cited 20 November 2020]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553217/>
17. Storch, A.S., Mattos, J.D. de, Alves, R., Galdino, I. dos S., and Rocha, H.N.M. Methods of Endothelial Function Assessment: Description and Applications. *Int. J. Cardiovasc. Sci*. 2017; 30(3), 262–273.
18. Mudau M, Genis A, Lochner A, Strijdom H. Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis. *Cardiovascular Journal of Africa*. 2012;23(4): 222-231.

19. A L, JC B. Intact and altered endothelium in regulation of vasomotion [Internet]. PubMed. 2020 [cited 26 November 2020]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1424046/>
20. Anderson TJ. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J Am Coll Cardiol*. 1999; 34: 631–638.
21. Incalza M, D’Oria R, Natalicchio A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascular Pharmacology*. 2018; 100:1-19.
22. Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, *et al*. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *J Am Coll Cardiol*. 1994; 24: 1468–1474.
23. Widlansky M, Gokce N, Keaney J, Vita J. The clinical implications of endothelial dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2003;42(7):1149-1160.
24. Libby P, Ridker P, Hansson G. Inflammation in Atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009;54(23):2129-2138.
25. U.S. Department of Health and Human Services. How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: A Report of the Surgeon General. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health. 2010.
26. Park K, Park W. Endothelial Dysfunction: Clinical Implications in Cardiovascular Disease and Therapeutic Approaches. *Journal of Korean Medical Science*. 2015;30(9):1213.
27. Ichiki T. Collaboration between smokers and tobacco in endothelial dysfunction. *Cardiovascular Research*. 2011;90(3):395-396.
28. Teixeira B, Lopes A, Macedo R, Correa C, Ramis T, Ribeiro J *et al*. Inflammatory markers, endothelial function and cardiovascular risk. *Jornal Vascular Brasileiro*. 2014;13(2):108-115.
29. Zhang J, Cao Y, Xu C, Edvinsson L. Lipid-soluble smoke particles damage endothelial cells and reduce endothelium-dependent dilatation in rat and man. *BMC Cardiovascular Disorders*. 2006;6(1).
30. Ley K, Huo Y. VCAM-1 is critical in atherosclerosis. *Journal of Clinical Investigation*. 2001;107(10):1209-1210.

31. Neunteufl T, Heher S, Kostner K, Mitulovic G, Lehr S, Khoschsorur G *et al.* Contribution of nicotine to acute endothelial dysfunction in long-term smokers. *Journal of the American College of Cardiology*. 2002;39(2):251-256.
32. Lau P, Li L, Merched A, Zhang A, Ko K, Chan L. Nicotine Induces Proinflammatory Responses in Macrophages and the Aorta Leading to Acceleration of Atherosclerosis in Low-Density Lipoprotein Receptor -/- Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2006;26(1): 143-149.
33. Napoli C, de Nigris F, Williams-Ignarro S, Pignalosa O, Sica V, Ignarro L. Nitric oxide and atherosclerosis: An update. *Nitric Oxide*. 2006;15(4): 265-279.
34. Ambrose J, Barua R. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;43(10):1731-1737.
35. Donohue J. Ageing, smoking and oxidative stress. *Thorax*. 2006;61(6): 461-462.
36. He Z, Chen Y, Hou C, He W, Chen P. Cigarette Smoke Extract Changes Expression of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) and p16(INK4a) and is Related to Endothelial Progenitor Cell Dysfunction. *Medical Science Monitor*. 2017;23:3224-3231.
37. Messner B, Bernhard D. Smoking and Cardiovascular Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2014;34(3):509-515.
38. Yamaguchi Y, Haginaka J, Morimoto S, Fujioka Y, Kunitomo M. Facilitated nitration and oxidation of LDL in cigarette smokers. *Eur J Clin Invest*. 2005; 35:186-193.
39. Grant R, Drummond GR, Cai H, *et al.* Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. *Circ Res*. 2000; 86: 347-354.
40. Li H, Oehrlein SA, Wallerath TH, *et al.* Activation of protein kinase C alpha and/or epsilon enhances transcription of the human endothelial nitric oxide synthase gene. *Mol Pharmacol*. 1998; 53: 630-637.
41. Hink U, Li H, Mollnau H, *et al.* Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res*. 2001; 88: E14-E
42. Gutterman DD. Vascular dysfunction in hyperglycemia: is protein kinase C the culprit?. **Circ Res**. 2002; 90: 5-7.

43. Wooten JB, Chouchane S, McGrath TE. Tobacco smoke constituents affecting oxidative stress. In: Halliwell Barry B, Poulsen Henrik E., editors. *Cigarette Smoke and Oxidative Stress*. Springer-Verlag; Berlin Heidelberg: 2006.
44. Kumar U, Mishra M, Prakash V. Assessment of antioxidant enzymes and free radical scavenging activity of selected medicinal plants. *Free Radicals and Antioxidants*. 2012;2(3):58-63.
45. Jaimes E, DeMaster E, Tian R, Raji L. Stable Compounds of Cigarette Smoke Induce Endothelial Superoxide Anion Production via NADPH Oxidase Activation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2004;24(6):1031-1036.
46. Marwan, M., Widjajanto, E., Karon, S. The Effect of Black Seed Crude Extract (*Nigella sativa*) on GSH and MDA Level, Number and Function of Lung Alveolar Macrophage of *Wistar* Rat which Exposed by Chronic Cigarette Smoke. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, XXI(5). 2005; 6–8
47. Ardiana, M., Santoso, A., Hermawan, H.O., Nugraha, R.A., Pikir, B.S., Suryawan, I.G.R. Acute effects of cigarette smoke on Endothelial Nitric Oxide synthase, vascular cell adhesion molecule 1 and aortic intima media thickness. *F1000Research* 2021, 10:396.
48. Karaçil Ermumucu M, Şanlıer N. Black Cumin (*Nigella sativa*) and Its Active Component on Thymoquinone: Effects on Health. *Journal of Food and Health Science*. 2017;170-183.
49. Hussain, D.A., and Hussain, M.M. *Nigella sativa* (black seed) is an effective herbal remedy for every disease except death – a Prophetic statement which modern scientists confirm unanimously: A review. *Adv. Med. Plant Res*. 2016; 4(2), 27–57.
50. Ahmed, S., Alam, A., Husain, S., Ahmed, Z. and Shahabuddin, M. Shoneez. (*Nigella sativa*) and its therapeutic effect in Unani Medicine-A Review. *IJPSR*. 2015; 6(01),12–14.
51. Paul, N.H., Makozho, E.R., Choto, K., Mandikuwaza, G., Mutambanengwe, C.G., and Sibanda, E. Evidence-Based Strategy for Cancer Prevention: Advocating for the Adoption of Black Cumin (*Nigella sativa*) Herbal Gardens in Zimbabwe. *Res. Rev. Med. Clin. Oncol*. 2017; 1(2), 1–7.
52. Farah, N., Fauzi, A., Hidayah, N., Bakar, A., Mohamad, N., Hadzrullathfi, S., Fauzi, A. *Nigella sativa* Effects on Neurotransmitter Systems: Potential Treatment for Drug Tolerance and Dependence. *Int. J. Pharm. Res. Allied Sci*. 2018; 7(1):196-200

53. Islam, M.T., Guha, B., Hosen, S., Riaz, T.A., Shahadat, S., da Rocha Sousa, L., de Oliveira Santos, J.V., da Silva Júnior, J.J., de Lima, R.M.T., Braga, A.L., dos Reis, A.C., de Alencar, M.V.O.B., de Carvalho Melo-Cavalcante, A.A. Nigellalogy: A Review on *Nigella Sativa*. *MOJ Bioequiv*. 2017; 3(6):167–181.
54. Musfiroh, M. and Gustari, S. The Effect of Black Seed (*Nigella sativa* L) Oil on Spermatogenesis of Wistar Rats Exposed by Cigarette Smoke. *Jurnal Kedokteran Hewan*. 2015; 9(2), 114–116.
55. Hidayati, T and Habib, I. Antiimmunotoxic of Black Cumin Seed Oil (*Nigella sativa* Oil) in DMBA (Dimethylbenzanthracene)-Induced Mice. *Int. J. Pharm. Med. Biol. Sci*. 2015;4(3), 171–174.
56. Tavakkoli, A., Mahdian, V., Razavi, B.M., and Hosseinzadeh, H. Review on clinical trials of black seed (*Nigella sativa*) and its active constituent, Thymoquinone. *J. Pharmacopuncture*. 2017; 20(3), 179–193.
57. Al-Naqeep, G., Al-Zubairi, A.S., Ismail, M., Amom, Z.H., and Esa, N.M. Antiaterogenic potential of *nigella sativa* seeds and oil in diet-induced hypercholesterolemia in rabbits. *Evid. Based Complemen. Alternate. Med*, 2011; 213628.
58. Mohammed, E.T., Hashem, K.S., Ramadan, M., and Rheim, A. Biochemical study on the impact of *Nigella sativa* and virgin olive oils on cadmiuminduced nephrotoxicity and neurotoxicity in rats. *J. Investig. Biochem*. 2014; 3(2). 71-78.
59. Botnick, I., Xue, W., Bar, E., Ibdah, M., Schwartz, A., Joel, D.M, Lev, E., Fait, A., Lewinsohn, E. Distribution of primary and specialized metabolites in *Nigella sativa* seeds, a spice with vast traditional and historical uses. *J. Molecules*. 2012.
60. Kliebsentein. Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinted glasses. *Plant Cell Environ*. 2014; 27(6), 675-684.
61. Cirak, C., Radusiene, J., Ivanauskas, L., Jakstas, V., Camas, N. 2015. Population variability of main secondary metabolites in *Hypericum lydium* Boiss. (Hypericaceae). *Iran. J. Pharm. Res*. 2015; 14, 969-978.
62. Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. Production of plant secondary metabolites: A historical perspective. *Plant. Sci*. 2001; 161(5):839-851.
63. Lewinsohn E, Botnick I, Xue W, Bar E, Ibdah M, Schwartz A, Joel DM, Lev E, Fait A. Distribution of primary and specialized metabolites in *Nigella sativa* seeds, a spice with vast traditional and historical uses. *J Molecules*. 2012;17: 10159-10177.

64. Iqbal, M.S., Ahmad, A., and Pandey B. 2018. Solvent based optimization for extraction and stability of *Thymoquinone* from *Nigella sativa* Linn. and its quantification using RP-HPLC. *Physiol Mol. Biol. Plants*. 2018;24(6): 1209-1219.
65. Mardisiwi, R.S. Kurniawati, A., Sulistyono, E., dan Faridah, D.R. Pertumbuhan Tanaman dan Produksi Timokuinon Jintan Hitam pada Beberapa Komposisi Media Tanam dan Interval Penyiraman. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. *J. Agron. Indonesia*. 2018;46(1):89-94
66. Ashurst, J.V., and Nappe, T.M. Toxicity, Methanol. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019.
67. Kazemi, M. Chemical composition and antioxidant properties of the essential oil of *Nigella sativa* L. *Bangladesh J. Botany*. 2015; 44(1), 111-116.
68. Amina, B. Toxicity and anti-oxidant activity of the essential oil of *Nigella sativa*. *Der. Pharmacia Lettre*. 2016;8(15), 245–249.
69. Youssef, A., Madkour, K., Cox, C. and Weiss, B. 1992. Comparative lethality of methanol, ethanol and mixtures in female rats. *J. Appl. Toxicol*. 1992; 12(3), 193–197.
70. Mansour, M.A., Nagi, M.N., El-Khatib, A.S., dan Al-Bekairi, A.M. Effects of thymoquinone on antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation and DT-diaphorase in different tissues of mice: a possible mechanism of action. *Cell Biochemistry and Function*. 2002; 20(2), 143–151.
71. Guergouri, F.Z., Sobhi, W., and Benboubetra, M. Antioxidant activity of Algerian *Nigella sativa* total oil and its unsaponifiable fraction. *Int. J. Phytopharm*. 2017;6(4), 234–238.
72. Kanter, M., Meral, I., Dede, S., Cemek, M., Ozbek, H., Uygan, I., and Gunduz, H. Effects of *Nigella sativa* L. and *Urtica dioica* L. on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and some liver enzymes in CCl<sub>4</sub>-treated rats. *J. Vet., Med. Physiol. Pathol. Clin. Med*. 2003;50(5), 264-268.
73. Meral, I., Yener, Z., Kahraman, T., Mert, N. Effect of *Nigella sativa* on glucose concentration, lipid peroxidation, antioxidant defence system and liver damage in experimentally induced diabetic rabbits. *J. Vet. Med. Physiol. Pathol. Clin. Med*. 2015;48 (10), 593-9.
74. Er şahin, M., Toklu, H. Z., Akakin, D., Yuksel, M., Yeg n, B.C., Sener, G. The effects of *Nigella sativa* against oxidative injury in a rat model of subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochir*. 2011;153, (2), 333–341.

75. Sadik, I., Allah, A.A., Abdulhameed, M., and Abdelkader, M. 2017. Antioxidant activity and in-vitro Potential inhibition of *Nigella sativa* and *Saussurea lappa* against LDL oxidation among Sundance, E3 Journal of Medical Research.2017;6(3), 022-026.
76. Houcher, Z, Boudiaf, K., Benboubetra, M., and Houcher, B. Effects of Methanolic Extract and Commercial Oil of *Nigella sativa* L. on Blood Glucose and Antioxidant Capacity in Alloxan-Induced Diabetic Rats. Pteridines. 2007;18(1), 8-18.
77. Alsuhaibani, A.M.A. Effect of *Nigella sativa* against cisplatin induced nephrotoxicity in rats. Ital. J. Food. Saf. 2018;7(2), 7242.
78. Abbasnezhad, A., Hayadavoudi, P., Niazmand, S., and Mahmoudabady, M. 2014. The effects of hydroalcoholic extract of *Nigella sativa* seed on oxidative stress in hippocampus of STZ-induced diabetic rats. *Avicenna J Phytomed*, 5 (4), 333-340.
79. Kaleem, M., Kirmani, D., Asif, M., Ahmed, Q., Bano, B. Biochemical effects of *Nigella sativa* L seeds in diabetic rats. Indian J. Exp. Biol. 2006;44: 745-748.
80. Gholamnezhad, Z., Boskabady, M.H., and Hosseini, M. Effect of *Nigella sativa* on immune response in treadmill exercised rat. BMC Complement. Altern. Med 2014;14(1), 1–11.
81. Al-Asoom, L.I. Coronary angiogenic effect of long-term administration of *Nigella sativa*. BMC Complement Altern Med. 2017;17(308), 1-7.
82. Ardiana, M., Utami, E.R., Pikir, B.S., Santoso, A. Preventive effect of *Nigella sativa* on M1/M2 ratio, reducing risk of endothelial dysfunction in cigarette smoked Wistars. F1000Research. 202110:917.
83. Hadad, G.M., Abdel, S.R.A., Soliman, R.M., Mesbah, M.K. High-Performance Liquid Chromatography Quantification of Principal Antioxidants in Black seed (*Nigella sativa* L.) Phytopharmaceuticals. J. AOAC Int. 2012;95 (4).
84. Velho-Pereira, R.M., Barhate, C.R., Kulkarni, S.R., Jagtap, A.G. Validated high-performance thin-layer chromatographic method for the quantification of thymoquinone in *Nigella Sativa* extracts and formulations. *Phytochem. Anal*, 2011;22(4), 367–373.
85. Koshak, A.E. Yousif, N.M., Fiebich, B.L., Koshak, E.A., and Heinrich, M. Comparative immunomodulatory activity of *Nigella sativa* L. preparations on proinflammatory mediators: A focus on asthma. *Front. Pharmacol*. 2018; 9.1–11.

86. McConnell, E.L., Basit, A. W. and Murdan, S. 2008. Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments. *J. Pharm. Pharmacol.* 2008;60(1), 63–70.
87. Yang, G.H., Li, Y.C., Wang, Z.Q., Liu, B., Ye, W., Ni, L, Liu, C.W. Protective effect of melatonin on cigarette smoke-induced restenosis in rat carotid arteries after balloon injury. *J. Pineal. Res.* 2014;57(4), 451–458.
88. Teasdale, J.E., Hazell, G., Newby, A.C., and White, S.J. Paradoxical effects of cigarette smoke extract and high laminar flow on tumour necrosis factor-alpha induced VCAM-1 up-regulation – Implications for endothelial dysfunction. *Atherosclerosis.* 2014;237(2), e13–e14.
89. Pott, G.B., Tsurudome, M., Bui, J., Banfield, C., Hourieh, S., Pratap, H., and Goalstone, M.L. VCAM-1 Mediates Cigarette Smoke Extract Enhancement of Monocyte Adhesion to Human Carotid Vascular Endothelial Cells. *Med. Res. Arch.* 2017;5(7).
90. Mu, W., Chen, M., Gong, Z., Zheng, F., and Xing, Q. Expression of vascular cell adhesion molecule-1 in the aortic tissues of atherosclerotic patients and the associated clinical implications. *Exp. Ther. Med.* 2015;10(2), 423-428.
91. Farhangi, M.A., and Tajmiri, S. 2020. The effects of powdered black cumin seeds on markers of oxidative stress, intracellular adhesion molecule (ICAM)-1 and vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 in patients with Hashimoto's thyroiditis. *Clin. Nutr. ESPEN.* 2020;37: 207-212.
92. Khan, B.V., Harrison, D.G., Olbrych, M.T., Alexander, R.W., and Medford, R.M. 1996. Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1996;93(17), 9114-9119.
93. De Caterina, R., Libby, P., Peng, H.B., Thannickal, V.J., Rajavashisth, T.B., Gimbrone, M.A., and Liao, J.K. 1995. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J. clin. Inves.* 1995;96(1), 60-68.
94. Umar, S., Hedaya, O., Singh, A.K., and Ahmed, S. Thymoquinone inhibits TNF- $\alpha$ -induced inflammation and cell adhesion in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by ASK1 regulation. *Toxicol. App. Pharma.* 2015; 287(3), 299–305.



# Glosarium



- Adenosine Triphosphate (ATP) : Suatu ester dari adenosine dan asam triphosphoric.
- Basic Fibroblast Growth Factor : Suatu faktor pertumbuhan dan protein pengirim sinyal dengan kode gen FGF2.
- Tetrahydrobiopterin : Kofaktor essensial dalam produksi NO oleh eNOS.

Karboksihemoglobin	: Kompleks karbon monoxide dengan hemoglobin yang stabil yang terbentuk dalam sel darah merah setelah kontak dengan karbon monoksida.
Katalase	: Enzim yang mengkatalisasi dekomposisi hydrogen peroksida menjadi air dan oksigen.
Cyclooxygenase	: Enzim yang bertanggung jawab dalam pembentukan prostanoids.
Deoxyribonucleic Acid	: Polimer yang terdiri dari dua rantai polinukleotida yang membawa instruksi genetic.
Endothelium-Derived Hyperpolarising Factor	: Vasodilator yang penting dalam microcirculation.
Endothelial Nitric Oxide Synthase	: Enzim yang dikodekan sebagai NOS3 dan terletak pada 7q35-7q36 kromosom 7
Electron Paramagnetic Resonance	: Suatu metode untuk mempelajari electron yang tidak berpasangan.
Endothelin-1	: Vasokonstriktor poten yang dikodekan sebagai gen EDN 1
Food and Drug Administration	: Departemen kesehatan dan pelayanan masyarakat di negara Amerika.
Flow-Mediated Dilation	: Dilatasi arteri saat terjadi adanya peningkatan aliran darah.
Growth Factor	: Zat yang dapat menstimulasi proliferasi sel, penyembuhan luka, dan pembedaan sel.
Glutathione	: Antioksidan yang ditemukan pada tumbuhan, hewan, jamur, dan beberapa bakteri.

Glutathione Peroxidase	: Nama sekumpulan enzim yang berguna untuk melindungi suatu organisme terhadap kerusakan oksidatif.
Hidrogen Sianida	: Gas tidak berwarna dengan bau seperti almond.
High Density Lipoprotein	: Protein yang bekerja menyerap kolesterol dan membawa menuju liver.
Hidrogen Peroksida	: Antiseptik ringan.
Hidrogen sulfida	: Suatu iritan dan asfiksi kimia yang berpengaruh pada penggunaan oksigen dan sistem saraf pusat.
High Sensitivity C-reactive Protein	: Dibentuk oleh tubuh saat dinding pembuluh darah membengkak.
High Performance Liquid Chromatography	: Teknik analisa yang digunakan untuk memisahkan bagian larut pada cairan tertentu.
Human Umbilical Vein Endothelial Cells	: Sel endotel yang di isolasi dari vena tali pusat.
Intercellular Adhesion Molecule-1	: Sel penting dalam mempromosikan adhesi dan transmigrasi leukosit.
Interferon	: Salah satu jenis molekul sitokin yang dihasilkan sel tubuh manusia sebagai respons terhadap berbagai jenis rangsangan.
Intima Media Thickness	: Pengukuran ketebalan tunika intima dan tunika media.
Inducible Nitric Oxide Synthases	: Salah satu oksigen reaktif dan enzim metabolisme nitrogen.
Low-density lipoprotein	: Lipoprotein yang membawa semua molekul lemak ke seluruh tubuh melalui air ekstraseluler.

Mitogen Activated Protein Kinase	: Protein kinase yang spesifik terhadap asam amino dan threonine.
Malondialdehyde	: Produk akhir daripada peroksidasi asam lemak dalam sel.
Mitochondrial Electron Transporter Chain	: Reaksi transfer electron yang menghasilkan ATP seluler melalui oxidative phosphorylation.
Milligram	: Ukuran berat.
Matrix Metalloproteinases	: Suatu metalloproteinase yang mengandung zinc dependen kalsium.
Natrium- Carboxymethyle Cellulose	: Derivat selulosa dengan kelompok carboxymethyl.
Nicotinamide Adenine Dinucleotide	: Suatu koenzim yang penting dalam metabolisme.
Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate	: Enzim yang digunakan dalam reaksi anabolic.
Nikotinamida Adenosin Dinukleotida Hidrogen	: Bentuk NADP <sup>+</sup> yang tereduksi.
Nitric Oxide	: Gas tanpa warna dengan formula NO.
Nitric Oxide Synthases	: Kelompok enzim yang mengkatalis produksi nitric oxide.
Neuronal Nitric Oxide Synthases	: Enzim yang bertanggung jawab dalam sintesis NO oleh neuron.
Oksigen	: Gas oksigen diatomic.
Oxidized-Low-Density Lipoproteins	: Suatu tipe kolesterol yang berbahaya yang diproduksi dalam tubuh.
Polisiklik Aromatik Hidrokarbon	: Adalah suatu golongan zat yang terbentuk secara alami pada arang, dan bensin.
Plasminogen Activator Inhibitor-1	: Berfungsi sebagai inhibitor tPA dan urokinase.

Platelet-Derived Growth Factor	: Salah satu faktor pertumbuhan yang meregulasi pertumbuhan dan pembedaan sel.
Penyakit Jantung Koroner	: Kondisi dimana terjadi penumpukan plaq pada dinding arteri.
Phosphat Buffer Sollution	: Solusi basa dengan pH 7,4.
Oksidasi Hidrokuinon	: Koenzim dengan derivative Q mengandung 5, 6-dimethoxy-3-methylbenzene-1,4-diol moiety
Reactive Oxygen Species	: Senyawa kimia yang sangat reaktif terbentuk dari O <sub>2</sub> .
Streptavidin- Hoseradish Peroxidase	: Digunakan dalam immunodetection daripada biotinylated protein.
Status Antioksidan Total	: Pengukuran total status antioksidan dalam tubuh.
Superoksida Dismutase	: Senyawa penting dalam antioksidan.
Tissue Factor	: Kofaktor daripada faktor VII/VIIa
Transforming Growth Factor-β	: Sitokin multifungsional yang termasuk pada keluarga transforming growth factor.
Type 1 T Helper Response	: Sel yang berperan mengaktifkan makrofag, dan imunitas secara seluler, serta respons perlindungan fagosit.
Type 2 T Helper Response	: Sel yang berperan dalam produksi antibody, aktivasi eosinophil, dan inhibisi dari beberapa fungsi makrofag.
Toll-Like Receptor	: Reseptor yang memulai respons imun innate.
Tumor Necrosis Factor-α	: Paracrine poten daripada fungsi inflamasi dan imunitas.

Tissue Plasminogen Activator	: Protein yang bekerja dalam memecahkan pembekuan darah.
Total Partikulat Matter	: Benda partikulat udara dengan ukuran 100 micro meter.
Tembakau-Spesifik Nitrosamine	: Senyawa kimia berbahaya yang ditemukan dalam tembakau.
Thromboxane A2	: Suatu thromboxane yang diproduksi oleh platelet aktif selama hemostasis.
Vascular Adhesion Molecule-1	: Molekul adhesi sel penting yang berhubungan dengan inflamasi.
Vascular Endothelial Growth Factor	: Faktor angiogenik yang poten.
Vascular Smooth Muscle Cells	: Sel stromal pada dinding pembuluh darah.
Von Willebrand Factor	: Glikoprotein darah yang berhubungan dengan hemostasis.
World Health Organization	: Organisasi kesehatan dunia.

# Indeks



## **A**

Antioksidan, ix, 109  
Aorta, 7–79, 90–91, 98  
Aterosklerosis, 2, 6, 65

## **D**

Disfungsi endotel, 2, 9

## **E**

Endotelium, 8

eNOS, vi, viii, 2, 10, 13, 20, 28–29, 73,  
78–85, 88–89, 93, 98, 105

## **J**

Jantung, ix, 2, 6, 109  
Jintan hitam, vi, 2, 56, 59, 65, 68, 88

## **K**

Karbon monoksida, vii, 17

**M**

Makrofag, 14, 69

**N**

Nekrosis, 14  
Nikotin, 16–17, 67

**P**

Pembuluh darah, 6

**R**

Radikal bebas, 12, 19–20, 26, 81  
Rokok, 2, 6, 20, 23, 77, 80

**S**

Sitokin, 22, 109

**T**

Tikus, 78

**V**

VCAM-1, ix, 2, 9–11, 13, 25, 28, 30, 68, 73,  
79, 84–90, 93–94, 97, 103



# Jintan Hitam

*Pencegah  
Kerusakan Endotel  
karena Rokok*

