

# Pencegahan Kerusakan Pembuluh Darah akibat Rokok dengan Jintan Hitam

*by Meity Ardiana Fk*

---

**Submission date:** 05-Jul-2022 01:00PM (UTC+0800)

**Submission ID:** 1866787396

**File name:** n\_Kerusakan\_Pembuluh\_Darah\_akibat\_Rokok\_dengan\_Jintan\_Hitam.docx (21.9M)

**Word count:** 14207

**Character count:** 93463

Pencegahan Kerusakan Pembuluh Darah akibat  
Rokok dengan Jintan Hitam

Meity Ardiana

## BAB 1

### PENDAHULUAN

Lebih dari 7 juta kematian per-tahun di dunia disebabkan oleh paparan asap 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 pernafasan, 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 pro-oksidan 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 anti-inflamasi dan anti-trombotik pada pembuluh darah. Turunnya kadar NO turut meningkatkan permeabilitas endotel, mempermudah pergerakan sitokin-sitokin pro-inflamasi dan ekspresi molekul adesi 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 adesi makrofag pada endotel yang kemudian memicu proses inflamasi. Serangkaian proses ini menyebabkan aterosklerosis, sebuah kondisi di mana pembuluh darah menyempit akibat penimbunan lipid dan jaringan fibrosa yang dimediasi oleh respon-respon 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 system Ayurveda dan *Tibbenabvi* (pengobatan nabi). Jintan hitam dan komponen turunannya, terutama *thymoquinone*, memiliki potensi *radical scavenging* serta penghambatan stress 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 anti inflamasi maupun anti trombotik.<sup>13</sup>

Kemampuan-kemampuan jintan hitam ini menunjukkan potensi untuk pemanfaatannya sebagai pencegahan kerusakan pembuluh darah, dan pada akhirnya, penyakit-penyakit yang disebabkan oleh kerusakan pembuluh darah.<sup>14</sup> Namun, hingga saat penulisan 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.

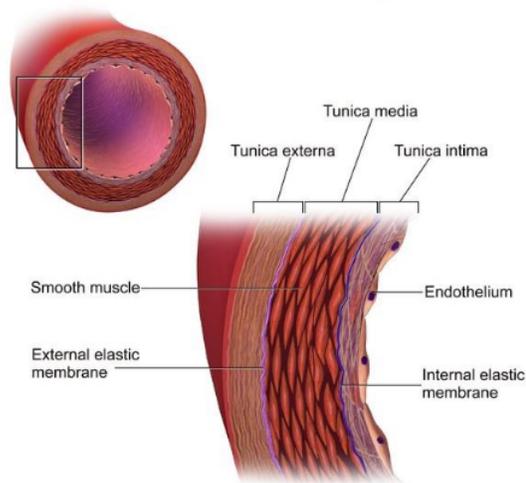
Atas dasar ini penulis melakukan penelitian untuk mengetahui efek pemberian jintan hitam, sehingga diharapkan dapat memberikan informasi baru terutama dalam penyakit pembuluh darah dan paparan asap rokok. Buku ini berdasarkan penelitian eksperimental yang menggunakan subjek tikus *Wistar* yang diberi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

## BAB 2

### KERUSAKAN PEMBULUH DARAH AKIBAT ASAP ROKOK

#### Struktur Pembuluh Darah

Pembuluh darah pada tubuh manusia dianalogikan sebagai sebuah pipa di mana 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>



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

Secara histologis, 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, begitupun 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>

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 bertanggungjawab 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 diselubungi 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>

### **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 respon 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 ekstrasvaskular, 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, menghambat fungsi platelet, dan menghalangi respon inflamasi.<sup>15</sup>

### **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 terjadi saat 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, di mana 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 perekrutan 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>

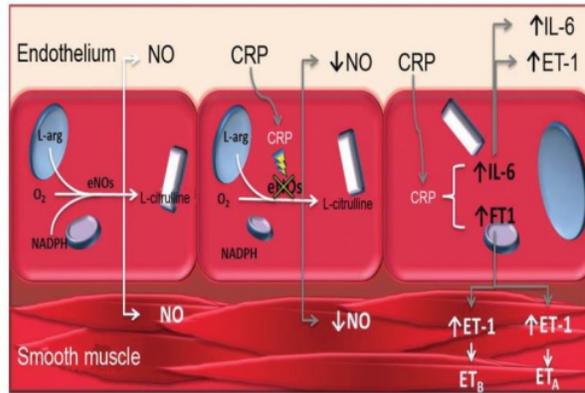
Disfungsi endotel dipicu oleh berbagai faktor risiko kardiovaskuler, termasuk yang dapat diubah seperti merokok, hiperkolesterolemia, hipertensi, hiperglisemia, dan yang tidak dapat diubah seperti usia lanjut dan riwayat keluarga dengan penyakit aterosklerotik dini.<sup>22,23,24</sup> Keterkaitan disfungsi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

### **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* (BH<sub>4</sub>), 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 BH<sub>4</sub>

akan mengurangi oksigen molekuler pada L-arginin dan memproduksi O<sup>2-</sup> yang disebut juga sebagai fenomena ‘*eNOS uncoupling*’.<sup>10,27</sup> Proses ini berperan dalam disfungsi endotel melalui peningkatan stress oksidatif.<sup>10</sup>



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

*C-reactive protein* (CRP), sebuah protein anular pentamerik yang berikatan dengan fosfokolin di permukaan sel yang mati atau sekarat, meningkat sebagai respon 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>

### <sup>32</sup> **Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1)**

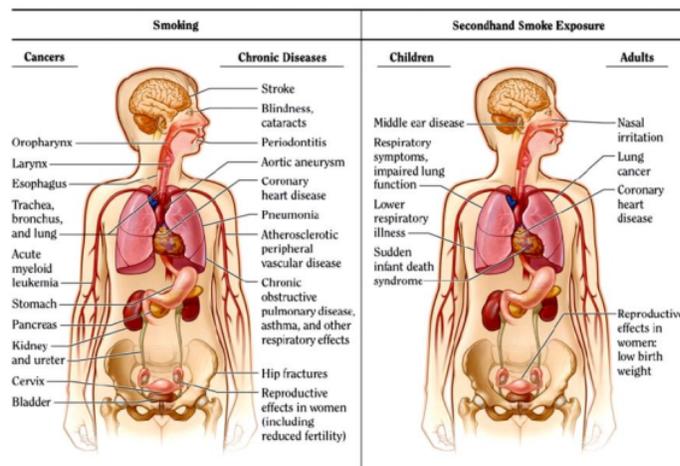
*Vascular Cell Adhesion Molecule 1* atau VCAM-1 merupakan salah satu molekul adhesi yang mirip dengan imunoglobulin dan diekspresikan pada sel endotel yang teraktivasi. Secara molekuler, VCAM-1 berikatan dengan integrin  $\alpha 4\beta 1$  yang diekspresikan di limfosit, monosit, dan eosinofil. VCAM-1 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>

## 1 Asap rokok

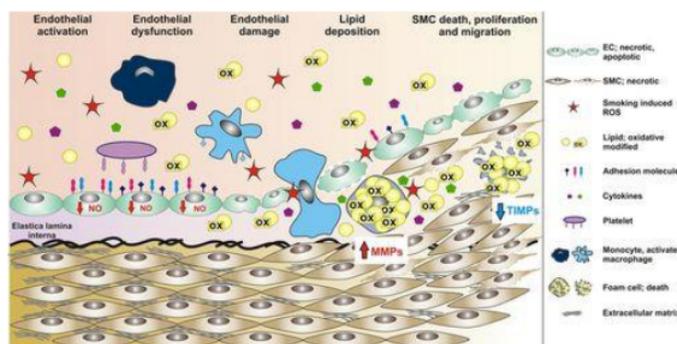
Asap rokok yang dihirup ke mulut perokok aktif dikenal sebagai asap *mainstream*, sedangkan asap yang keluar dari ujung rokok yang terbakar disebut asap *sidestream*. Asap *sidestream* mengandung konsentrasi gas beracun yang lebih tinggi daripada *mainstream*, seperti hidrokarbon aromatic polisiklik (*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>

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



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

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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.<sup>40,41,42</sup>



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

Stress 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 trombosit. 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>

Makrofag juga teraktivasi dengan adanya ekspresi reseptor-reseptor molekul adhesi yang ada pada sel-sel endotel. Makrofag 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>

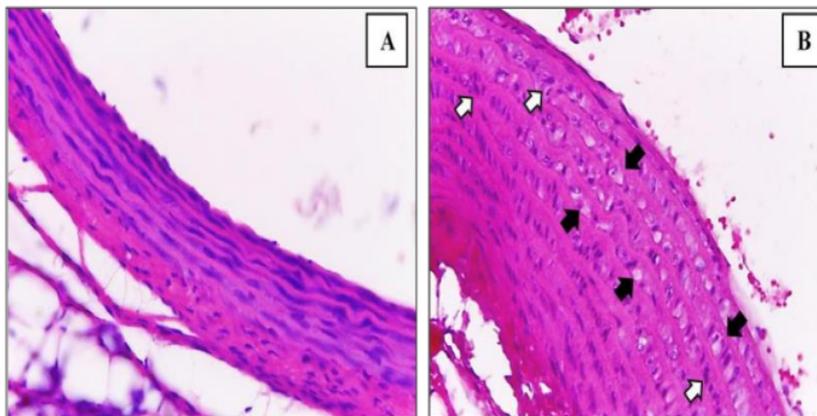
Asap rokok juga ditengarai memicu peningkatan proliferasi dan migrasi sel otot polos yang menyebabkan penebalan tunika intima dan formasi plak. Nekrosis pada sel otot polos lebih lanjut memicu peningkatan sinyal-sinyal inflamasi, termasuk enzim-enzim proteolitik intraseluler yang menyebabkan pembelahan 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 histologis 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 pre-klinik, 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 progresifitas 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>.

### **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>

### **Nikotin**

Alkaloid yang terkandung di daun tembakau antara lain yaitu antabin, anabasin, N-metilanabasin, nikotin, N-oksida, miosmin,  $\beta$ -nikotirin, kotinin, normikotin, 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 stress 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 dendritic untuk merangsang proliferasi sel T dan sitokin. Nikotin juga mempengaruhi sel dendritic 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>

### **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>

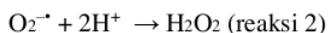
### **Kuinon**

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:



57 Superoksida dismutase (SOD) merupakan enzim yang melindungi sel dari toksisitas ROS selama respirasi aerobik, dengan cara mengkonversi 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>

### **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>

### **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 anti trombin.<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>

### **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>

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

Polisiklik aromatik hidrokarbon 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>

### 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.

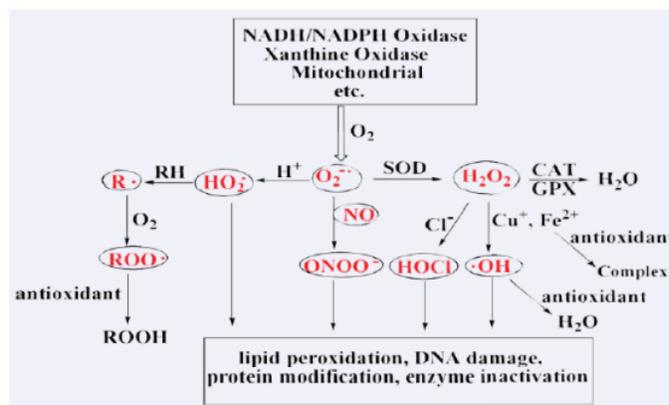
Enzim NADPH oksidase dalam pembuluh darah bertanggung jawab untuk produksi  $O_2^-$  saat terpapar ekstrak asap rokok.<sup>27</sup> Enzim NADPH oksidase terdiri dari lima isoform yaitu NOX 1-5. Peningkatan ekspresi NADPH oksidase subunit gp91phox dan NOX-4 pada arteri aterosklerotik, berkontribusi pada 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-reperfusi miokard disebabkan karena peningkatan ekspresi TNF- $\alpha$  melalui peningkatan aktivitas *xanthine oxidase*.<sup>18</sup>

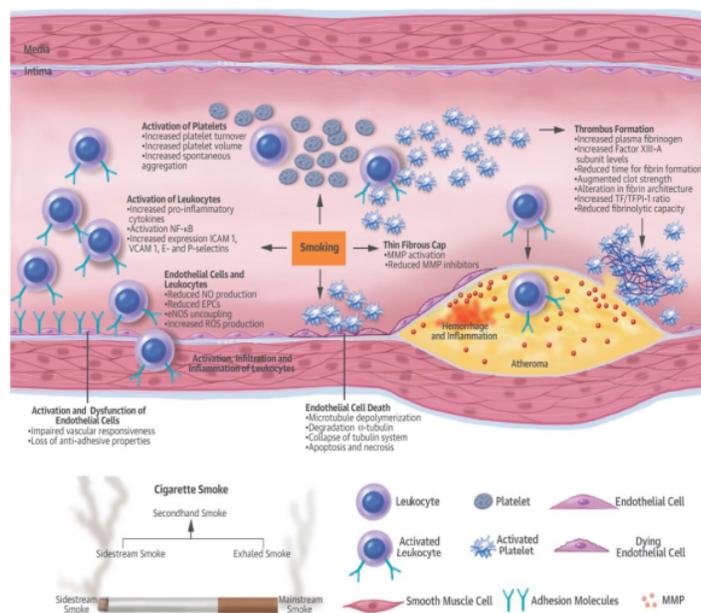
Molekul oksigen sangat penting untuk pembentukan energi dalam mitokondria, yang dikenal dengan proses fosforilasi oksidatif dengan hasil akhir seperti ATP, H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>, dan sejumlah kecil ROS. Produksi ROS yang berlebihan akan bersifat toksik.<sup>21</sup> Superoksida mitokondria merupakan sumber utama ROS intraseluler dalam kondisi fisiologis. Kadar O<sub>2</sub><sup>-</sup> mitokondria diatur oleh pernafasan dan aktivitas SOD yang terletak di matrik 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>

### 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 meta-analisis 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 meta-analisis 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 di mana 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 aterosclerosis di dalam asap rokok adalah (1) hidrokarbon aromatik polisiklik, (2) zat pengoksidasi, (3) partikel, dan (4) nikotin.



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

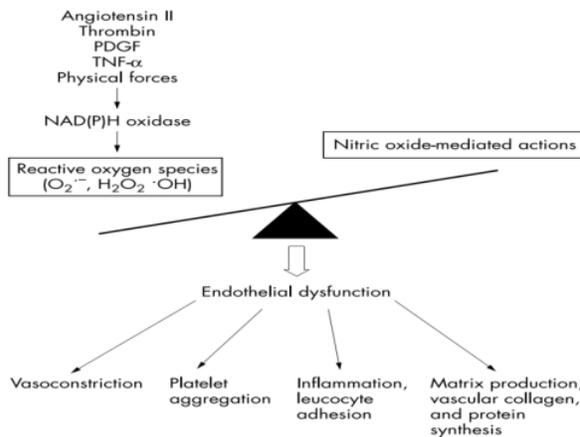
Salah satu faktor terpenting yang berkontribusi terhadap pro-aterogenik adalah nikotin, yang telah umum dipelajari dengan menggunakan kondensat asap rokok. Selain perannya sebagai agen pembiasa dalam tembakau, nikotin juga mempercepat aterosklerosis. Ada beberapa mekanisme potensial dari efek pro-aterogenik nikotin: (1) menginduksi disfungsi endotel, (2) memodifikasi profil lipid, (3) meningkatkan respon 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

55  
proliferasi dan migrasi sel otot polos vaskular ke dalam intima, yang sebagian dimediasi oleh TGF $\beta$ . Ini patomekanisme nikotin dapat menyebabkan peningkatan ketebalan media intima dari seluruh pembuluh darah, yang mengarah pada risiko lebih besar berkembangnya aterosklerosis.

Untuk mempelajari lebih lanjut tentang patomekanisme endotelium yang disfungsi, 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 prooksidasi dan antioksidan, dan keadaan proinflamasi dan anti-inflamasi. 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 pro-inflamasi dan pro-aterogenik 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.

45  
Jumlah total rokok yang dihisap 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>

<sup>18</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 ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), radikal hidroksil ( $\cdot OH$ ), dan singlet oksigen ( $O_2$ ).

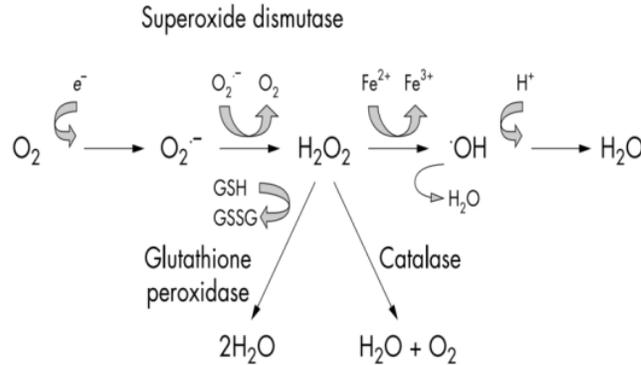
*Reactive Oxygen Species* secara fisiologis sebagai produk sampingan dari metabolisme sel, atau sebagai molekul toksik yang terlibat dalam pembunuhan bakteri dan pertahanan *host*. Radikal bebas secara alami dapat terbentuk dalam berbagai sistem biologis dan kimia yang menyebabkan kerusakan pada sistem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

<sup>24</sup> *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.

<sup>39</sup> Ketika produksi ROS melebihi kapasitas *buffer* sistem pertahanan antioksidan atau ketika enzim antioksidan rusak maka terjadi stres oksidatif. Faktor risiko kardiovaskular dan stress oksidatif memengaruhi pertahanan dari endotel dan menyebabkan disfungsi endotel, proliferasi dan migrasi VSMCs serta adesi dan migrasi leukosit.

<sup>41</sup> *Nitric Oxide* juga dapat dikonversi menjadi turunan yang lebih reaktif, sebagai *Reactive Nitrogen Species* (RNS), seperti *nitrogen dioxide* ( $NO_2$ ), *dinitrogen trioxide* ( $N_2O_3$ ), *nitrogen tetroxide* ( $N_2O_4$ ) dan peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) (Wooten *et al.*, 2006). Pembentukan peroksinitrit yang berlebihan menginduksi protein (seperti; hemoglobin, *myeloperoxidase* (MPO), *glutathione*

*peroxidase*, dan lain-lain), berfungsi mitokondria, berfungsi endotel dan apoptosis. Karena peroksinitrit berumur pendek dan sulit diukur secara langsung, maka yang dapat di ukur adalah 3-nitrotyrosine yang merupakan produk nitrasi tirosin oleh peroksinitrit secara in vivo.



**Gambar 9.** Generasi Spesies Oksigen Reaktif. Molekul oksigen ( $O_2$ ) bereaksi dengan elektron ( $e^-$ ) membentuk anion superoksida ( $O_2^-$ ). Anion superoksida diubah menjadi hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) oleh enzim superoksida dismutase. Hidrogen peroksida mengalami konversi spontan menjadi radikal hidroksil yang sangat reaktif ( $\cdot OH$ ) Atau, dapat didetoksifikasi melalui glutathione peroxidase atau *catalase* ke air ( $H_2O$ ) 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 pro-aterogenik. 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 respon 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.<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 pro-oksidan 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 aterogenik melalui beberapa mekanisme. IMT aorta pada penelitian ini meningkat pada kelompok K (+) 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 mempengaruhi struktur histologis 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 mempengaruhi 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 mempengaruhi 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>

**BAB 3**  
**JINTAN HITAM**

Jintan hitam (*Nigella sativa*) 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 10.** 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>



Gambar 11. Biji Jintan Hitam<sup>49</sup>

#### Klasifikasi taksonomi

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

#### 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 *nigellimine* dan *nigellimine-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 eicodadienoic (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, anti tumor, anti diabetes, anti hipertensi, antioksidan, anti jamur, imunomodulator, anti inflamasi, analgesik, anti virus, anti piretik, kontrasepsi, anti mikroba, anti konvulsan, antitusif, anti kanker, anti hiperlipidemik.<sup>42</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>48,52,53,56,57,58</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%) (Ghahramaloo *et al.*, 2017). 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%) (Dinakaran *et al.*, 2016). 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.

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. Hasilnya, *thymoquinone* ternyata memiliki IC50 (kekuatan penghambatan radikal bebas hingga 50%) pada *2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radicals scavenging assay* yang cukup tinggi yaitu sebesar 211  $\mu\text{g/mL}$  yang merupakan 46% dari IC50 ekstrak minyak jintan hitam yang sebesar 460  $\mu\text{g/mL}$ . 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 *carvacrol* 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 (Kausar *et al.*, 2017; Iqbal *et al.*, 2018). 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*. 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. 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. 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 progresifitas 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>

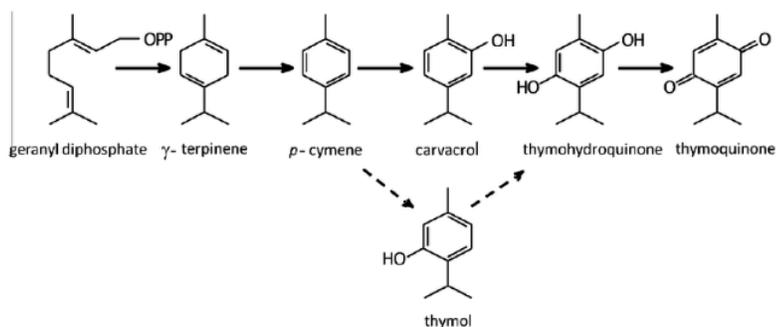
### ***Thymoquinone*, konstituen aktif jintan hitam**

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. 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 *γ-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 12.** 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 mengesktrak jintan hitam dari India pada berbagai pelarut untuk menentukan pelarut mana yang paling efektif untuk mengeluarkan kandungan dan stabilitas *thymoquinone* secara maksimal. 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 ( $13,0 \pm 0,8 \mu\text{g/ml}$ ), minyak esensial dari jintan hitam ( $14,56 \pm 0,4 \mu\text{g/ml}$ ) dan *carvacrol* ( $15,03 \pm 0,0 \mu\text{g/ml}$ ). Sedangkan LD50 untuk  *$\alpha$ -Thujene* ( $22 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$ ), *camphene* ( $23 \pm 0,9 \mu\text{g/ml}$ ), *bpinene* ( $19,4 \pm 0,0 \mu\text{g/ml}$ ), *p-cymene* ( $20 \pm 0,4 \mu\text{g/ml}$ ) dan  *$\gamma$ -terpinene* ( $20,03 \pm 0,6 \mu\text{g/ml}$ ).<sup>67</sup> Penelitian oleh Amina menyimpulkan bahwa kandungan total jintan hitam memiliki LD50  $56,88 \mu\text{g/ml}$ , yang terkait dengan keberadaan *thymoquinone* dan *hydrothymoquinone*.<sup>68,69</sup>

### Jintan Hitam, Disfungsi 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 pro-oksidan dan antioksidan. Aktivitas antioksidan *thymoquinone* adalah dengan cara mengurangi produksi ROS dan menghambat peroksidasi lipid secara tidak langsung. *Thymoquinone* bekerja pada antioksidan enzimatis maupun non-enzimatis. Menurut Woo *et al.*, *thymoquinone* adalah *scavenging*  $\text{O}_2^-$  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*  $\text{O}_2^-$  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  $\text{O}_2^-$ .<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 berkerja sebagai antioksidan dengan menekan pembentukan ROS dan RNS.<sup>14</sup> Kapasitas antioksidan dihubungkan dengan 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. 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 anti-inflamasi yaitu peningkatan IL-6, TNF $\alpha$  dan IL-10 serta penurunan IL-4.<sup>80</sup>

Paparan asap rokok mempengaruhi 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 2mg/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. 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 0,3g, grup perlakuan dengan dosis 0,6g, dan grup perlakuan dengan dosis 1,2g. Setelah 28 hari paparan asap rokok, rasio makrofag M1/M2 pada kelompok kontrol positif adalah  $4.97 \pm 3.42 (> 1)$ , di mana 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 jintan 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 pro-inflamasi atau M2 yang bersifat anti-inflamasi, 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 pro-oksidannya. 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. Namun studi lain oleh Dewhurst *et al.* menunjukkan hasil yang berbeda dimana makrofag M2 lebih dominan pada alveoli perokok.<sup>82</sup>

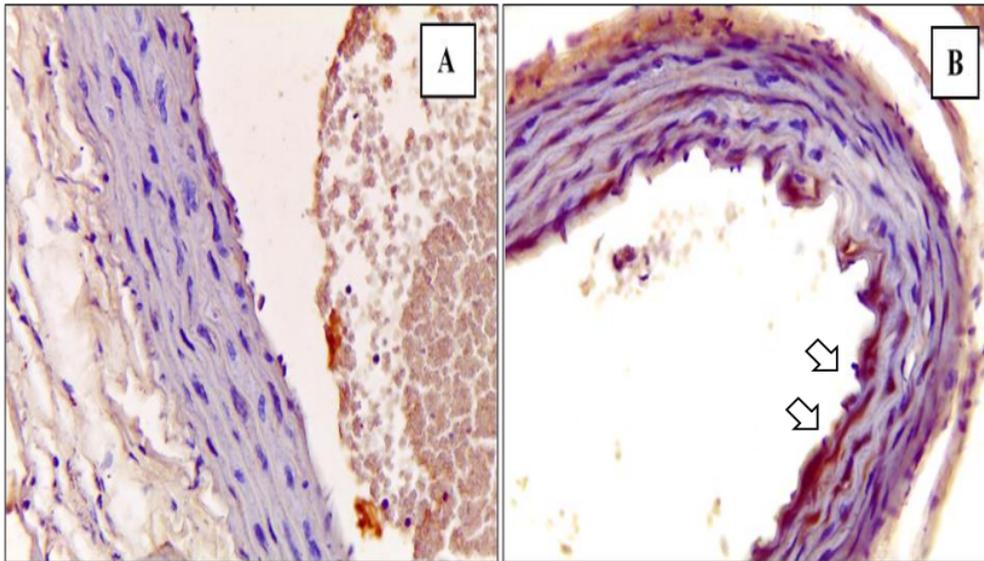
Hasil berbeda tersebut dapat dijelaskan melalui penelitian oleh Yuan *et al.* yang meneliti ekspresi makrofag M1 dan M2 pada mencit dengan pemberian ekstrak asap rokok dengan waktu paparan dan konsentrasi rokok yang berbeda. Mencit kontrol tanpa pemberian ekstrak asap rokok menunjukkan ekspresi makrofag basal dimana M1 lebih dominan dibandingkan dengan M2. Pemberian ekstrak asap rokok 2% selama 2 hari belum menunjukkan adanya polarisasi makrofag, dimana M1 masih lebih dominan dibandingkan M2. Pada hari ke-6, M2 beserta ekspresi sitokinya (*IL-10*, *IL-6*, *TGF- $\beta$ 1* and *TGF- $\beta$ 2*) lebih dominan dibandingkan M1 beserta ekspresi sitokinya (*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. 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>

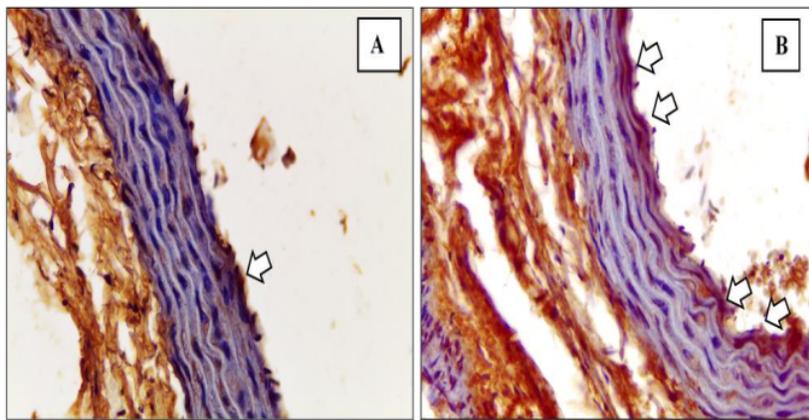
Polarisasi makrofag akibat paparan asap rokok dapat melalui tiga mekanisme yang berbeda yaitu melalui jalur *NF- $\kappa$ B*, *mitogen-activated protein kinase (MAPK)*, dan *Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT)*. Jalur-jalur ini merupakan jalur utama untuk produksi berbagai macam sitokin yang mempengaruhi 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- $\kappa$ B* yang kemudian menurunkan produksi sitokin pro-inflamasi seperti *TNF- $\alpha$* , *IL-1 $\beta$* , *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 mempengaruhi sinyal *MAPK* melalui kandungan akroleinnya. Paparan asap rokok selama 4 bulan dapat menghambat aktivasi *MAPK* dan menurunkan sitokin pro-inflamasi *TNF- $\alpha$*  dan *IL-12* sehingga makrofag M2 lebih banyak ditemukan (Hristova *et al.*, 2012; Metcalfe *et al.*, 2014). Paparan asap rokok yang cenderung lebih singkat memiliki efek yang berkebalikan yaitu adanya aktivasi *MAPK* sehingga meningkatkan produksi sitokin pro-inflamasi *TNF- $\alpha$*  dan *IL-8* (Koch *et al.*, 2004; Marumo *et al.*, 2014). 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 pro-inflamasi dan meningkatkan sitokin anti-inflamasi seperti *IL-12*, *IL-10*, *IL-6* dan *TGF- $\beta$*  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*.

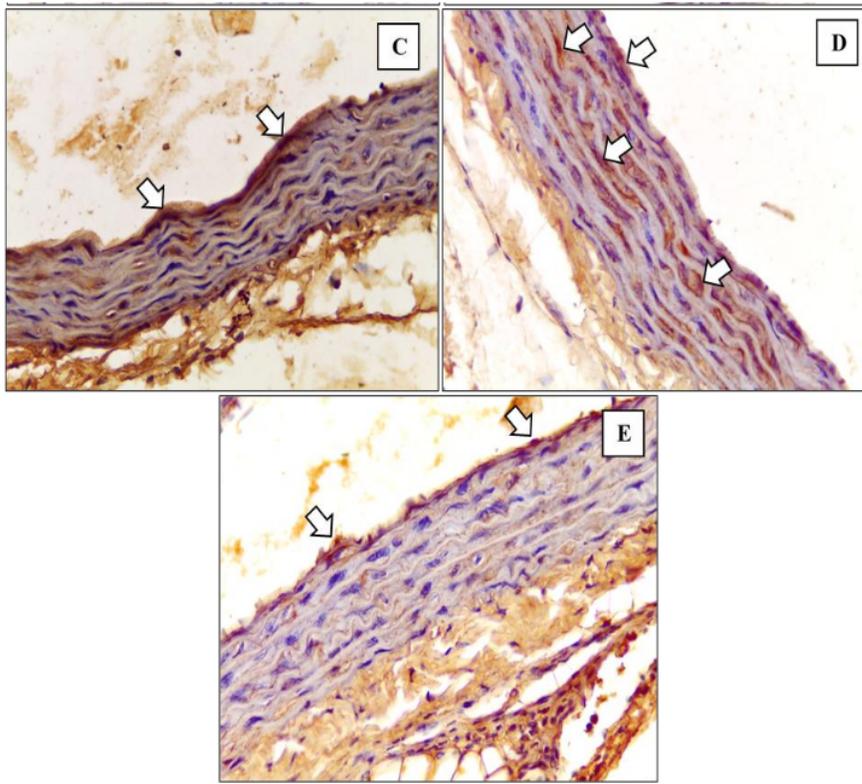


**Gambar 13.** Hasil pengamatan ekspresi M1 dengan marka CD38 (panah putih) pada (A) Kontrol negatif (B) Kontrol positif<sup>82</sup>



**Gambar 14.** Hasil pengamatan ekspresi M2 dengan marka *Egr-2* (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 (C) Perlakuan 1 (D) Perlakuan 2 (E) Perlakuan 3.<sup>82</sup>

#### BAB 4

### 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>

#### 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. (2012), Velho-Pereira et al. (2010) dan Koshak et al. (2018). 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  $\mu$ L 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 timokuinon 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 jintan 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 jintan hitam yang didapat.<sup>47,64</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*. 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. 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.<sup>64</sup>

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. 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.

Meskipun ekstrak jintan 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 jintan 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),<sup>16</sup> Hadad *et al.* (2012), Velho-Pereira *et al.* (2010) dan Koshak *et al.* (2018). 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 timokuinon adalah pada konsentrasi 0,5, 1, 2,5, 5, 10 dan 20 ppm.<sup>19</sup>

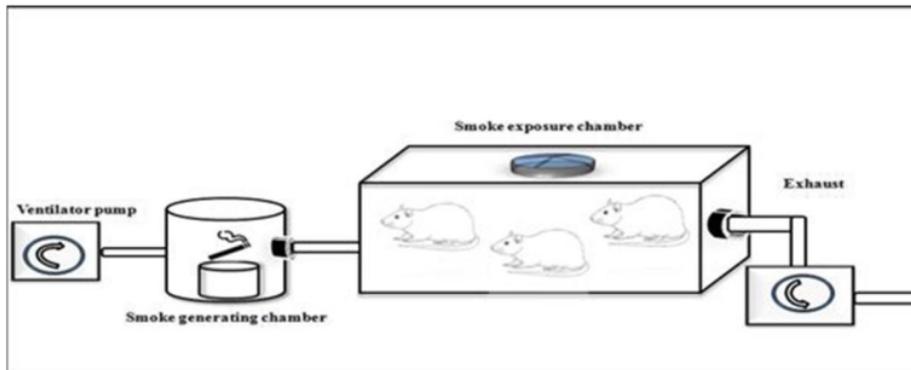
Pemberian ekstrak jintan hitam menggunakan metode di atas memiliki efek yang berbeda-beda tergantung dosis yang diberikan kepada hewan coba. Marwan *et al.* menggunakan dosis ekstrak jintan hitam sebesar 1,2 g/kgBB/hari selama 90 hari, dapat meningkatkan GSH dan menurunkan kadar MDA (Marwan *et al.*, 2005). 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.

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 (Alsuhaibani, 2018). Penelitian oleh Abbasnezhad *et al.* menunjukkan dosis ekstrak jintan hitam sebesar 0,2 mg/kgBB/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 (Abbasnezhad *et al.*, 2014). 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/KgBB/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 stress atau perobekan dinding lambung tikus.<sup>86</sup>

### 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 didalam 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.*, 2012 dan Jaldin *et al.*, 2013 yaitu 40 batang rokok/hari (8 rokok per 1x pemberian, dilakukan 5x sehari). Pemaparan rokok dilakukan setiap hari (280 rokok/minggu) selama 4 minggu (subkronik).



**Gambar 16.** Ilustrasi Tindakan Pemberian Asap dalam Ruang Tertutup pada Tikus<sup>82</sup>

1 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 thoraks. 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.

#### **Pemeriksaan Kadar *Endothelial 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.

#### **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 obyek 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 dibawah 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.** Sistem skor imunoreaktivitas.

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	

## **Pengaruh Paparan Asap Rokok dan Pemberian Ekstrak Jintan Hitam pada Pembuluh Darah**

### ***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

<sup>6</sup> 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, adesi 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.

<sup>1</sup> 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 pro-oksidan. 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.

### **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 pre-eklamsia 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, dimethylbenzanthracene (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 mempengaruhi 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 (Huang *et al.*, 2000). 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 efektifitasnya 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 pre-eklamsia 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 jintan 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 pro-oksidan. 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.

### **Ekspresi VCAM-1**

Pewarnaan imunohistokimia dengan metode *streptavidin-biotin complex* untuk menentukan ekspresi VCAM-1 pada aorta tikus. Jaringan aorta tikus difiksasi pada obyek 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 dibawah 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. Skor immunoreactivity scoring system (IRS)<sup>34</sup>

Skor persentase sel yang positif <sup>5</sup>	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	

Perekutan sel-sel inflamasi pada endotel merupakan salah satu proses awal terbentuknya aterosklerosis. Proses perekutan 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>

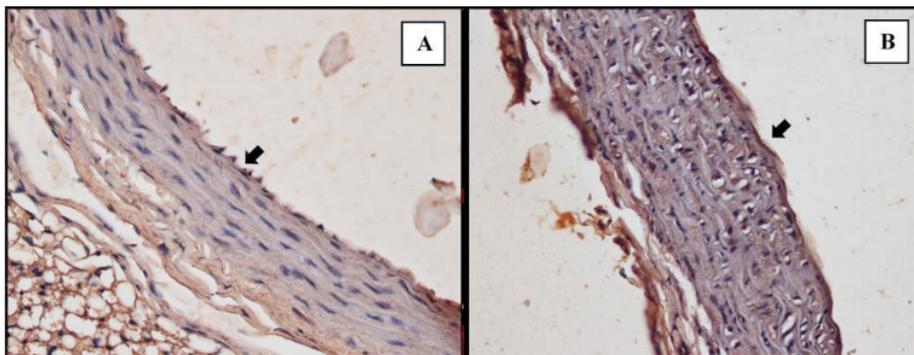
Proses akhir disfungsi endotel ditandai dengan meningkatnya IMT pembuluh darah. Analisis jalur yang dilakukan pada penelitian ini menunjukkan bahwa mekanisme asap rokok dalam menyebabkan disfungsi endotel adalah dengan cara meningkatkan IMT melalui penurunan eNOS. Pembahasan sebelumnya telah memaparkan 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

adesi 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>

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. Hasilnya, ekspresi VCAM-1 berkorelasi positif dengan kadar trigliserida, kolestrol 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 17.** Hasil pengamatan ekspresi VCAM-1 aorta (panah hitam) pada (A) Kontrol negatif (B) Kontrol positif<sup>82</sup>.

#### ***Hasil Ekspresi VCAM-1 setelah Pemberian Ekstrak Jintan Hitam***

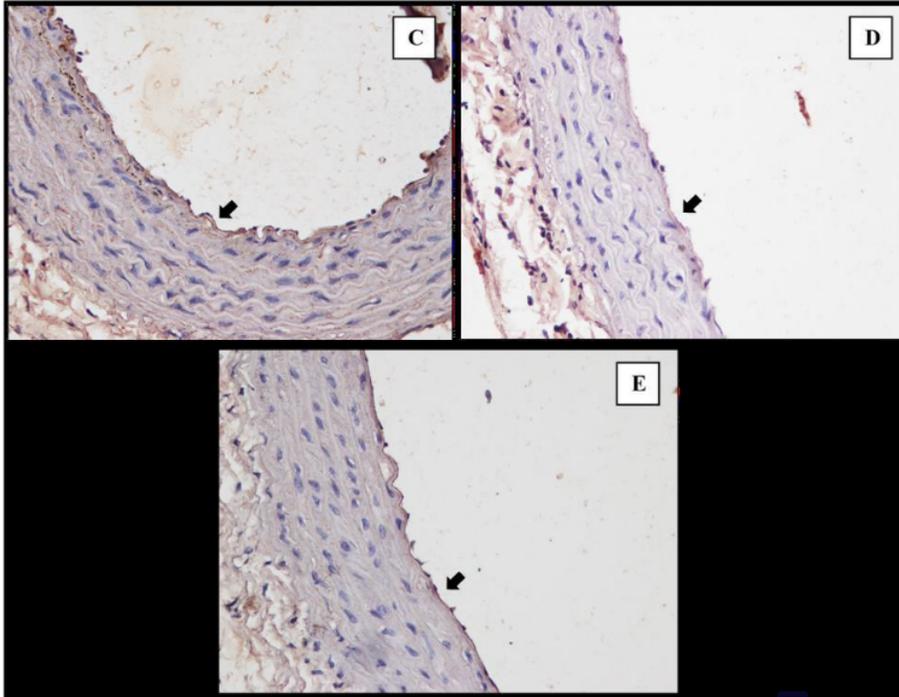
Jintan hitam memiliki kemampuan untuk menurunkan ekspresi VCAM-1 yang telah dibuktikan pada penelitian ini dengan turunnya ekspresi VCAM-1 pada P2 dan P3 secara signifikan. Farhangi et al., juga mendapati penurunan VCAM-1 serum pada pasien dengan tiroiditis Hashimoto's setelah pemberian suplementasi 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. 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>

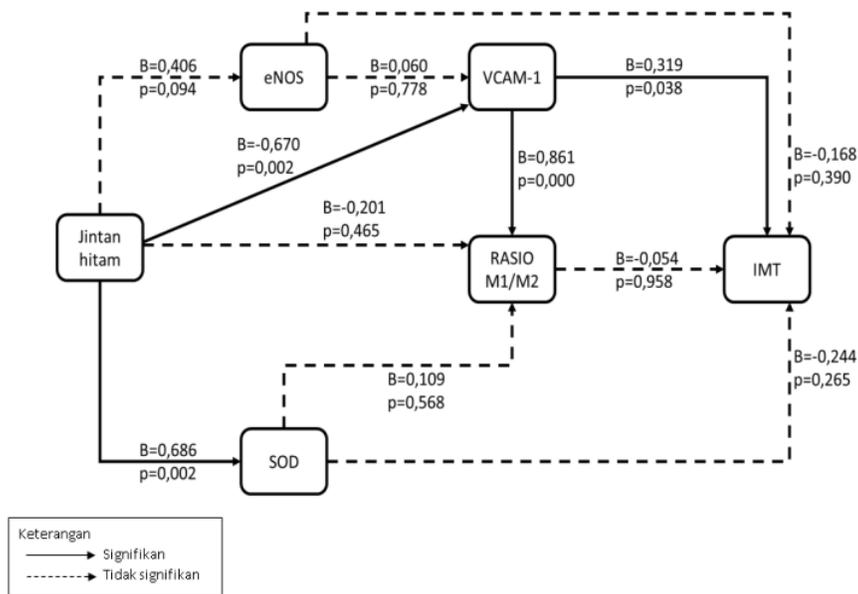
Kedua penelitian diatas juga menjelaskan bahwa peningkatan VCAM-1 berhubungan dengan sitokin pro-inflamasi seperti TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\alpha$ . Penghambatan sitokin tersebut juga dapat menurunkan VCAM-1. Sejalan dengan penelitian oleh Umar *et al.* yang menemukan bahwa kandungan *thymoquinone* 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 pro-inflamasi 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 18.** 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>.

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



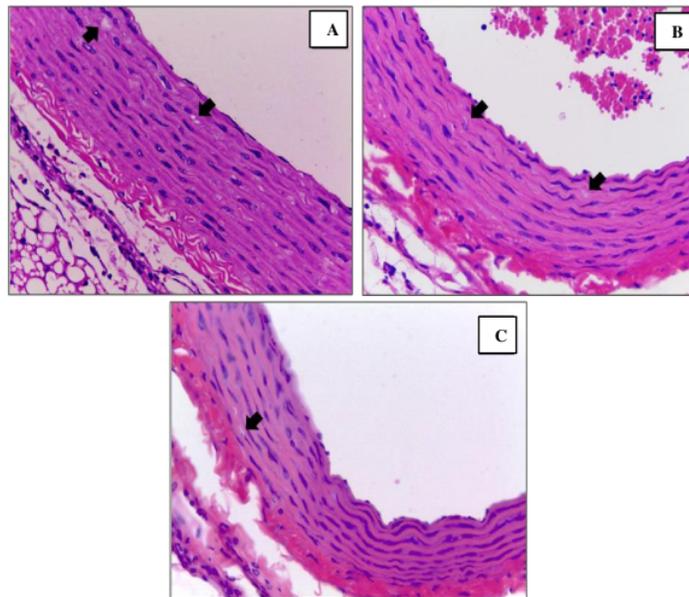
**Gambar 19.** Hasil analisa jalur jintan hitam terhadap variabel penelitian<sup>82</sup>

Paparan asap rokok memengaruhi struktur histologis aorta. Pada penelitian, ditemukan adanya perubahan struktural pada aorta yang ditandai adanya disorganisasi dan yakuolisasi 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.

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 *meltd paraffin* : *xylen* = 1:1 sekana 1 jam. *Meltd 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 diatas 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 20.** 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 pre-klinik, 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 progresifitas plak aterosklerosis selama tiga tahun. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa pemberian antioksidan dapat menurunkan ketebalan *IMT* hingga 74% jika dibandingkan dengan plasebo.

## BAB 5

### KESIMPULAN

Pemberian ekstrak etanol jantan 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).

# Pencegahan Kerusakan Pembuluh Darah akibat Rokok dengan Jintan Hitam

## ORIGINALITY REPORT

14%

SIMILARITY INDEX

13%

INTERNET SOURCES

4%

PUBLICATIONS

3%

STUDENT PAPERS

## PRIMARY SOURCES

1 repository.ub.ac.id 3%  
Internet Source

2 repository.unair.ac.id 2%  
Internet Source

3 docplayer.info 1%  
Internet Source

4 123dok.com 1%  
Internet Source

5 repository.usu.ac.id <1%  
Internet Source

6 Submitted to Universitas Brawijaya <1%  
Student Paper

7 Submitted to UIN Maulana Malik Ibrahim  
Malang <1%  
Student Paper

8 banglajol.info <1%  
Internet Source

idoc.pub

9	Internet Source	<1 %
10	id.123dok.com Internet Source	<1 %
11	www.jurnal.unsyiah.ac.id Internet Source	<1 %
12	eprints.undip.ac.id Internet Source	<1 %
13	Repository.Umsu.Ac.Id Internet Source	<1 %
14	Submitted to Universitas Airlangga Student Paper	<1 %
15	www.hindawi.com Internet Source	<1 %
16	"Black cumin (Nigella sativa) seeds: Chemistry, Technology, Functionality, and Applications", Springer Science and Business Media LLC, 2021 Publication	<1 %
17	www.scribd.com Internet Source	<1 %
18	text-id.123dok.com Internet Source	<1 %
19	repository.unisba.ac.id:8080 Internet Source	<1 %

20	f1000research.com Internet Source	<1 %
21	Submitted to Universitas Pelita Harapan Student Paper	<1 %
22	core.ac.uk Internet Source	<1 %
23	ejournal-s1.undip.ac.id Internet Source	<1 %
24	kemahasiswaan.ub.ac.id Internet Source	<1 %
25	Noven Hariyani, Siswanto Siswanto, Sri Suharyati, Purnama Edy Santosa. "TOTAL ERITROSIT DAN LEUKOSIT BROILER BETINA SETELAH PEMBERIAN JINTAN HITAM ( <i>Nigella sativa</i> ) SEBAGAI IMUNOMODULATOR DALAM AIR MINUM", Jurnal Riset dan Inovasi Peternakan (Journal of Research and Innovation of Animals), 2020 Publication	<1 %
26	www.neliti.com Internet Source	<1 %
27	Kevin Chikrista, Muhammad In'am Ilmiawan, Mitra Handini. "Efek protektif kombinasi minyak jintan hitam ( <i>Nigella sativa</i> ) dan madu pada ginjal tikus yang diberi pajanan cisplatin", Jurnal Cerebellum, 2021	<1 %

28

[www.mdpi.com](http://www.mdpi.com)

Internet Source

<1 %

29

[id.scribd.com](http://id.scribd.com)

Internet Source

<1 %

30

[journal.ipm2kpe.or.id](http://journal.ipm2kpe.or.id)

Internet Source

<1 %

31

[ejurnal.undana.ac.id](http://ejurnal.undana.ac.id)

Internet Source

<1 %

32

[lsd-project.jp](http://lsd-project.jp)

Internet Source

<1 %

33

[www.pantau.com](http://www.pantau.com)

Internet Source

<1 %

34

[jurnal.ugm.ac.id](http://jurnal.ugm.ac.id)

Internet Source

<1 %

35

Beatriks Lahamendu, Widdhi Bodhi, Jainer P. Siampa. "UJI EFEK ANALGETIK EKSTRAK ETANOL RIMPANG JAHE PUTIH (Zingiber officinale Rosc.var. Amarum) PADA TIKUS PUTIH JANTAN GALUR WISTAR (Rattus norvegicus)", PHARMACON, 2019

Publication

<1 %

36

[repositori.usu.ac.id](http://repositori.usu.ac.id)

Internet Source

<1 %

37

Submitted to iGroup

<1 %

38

[pt.scribd.com](https://pt.scribd.com)

Internet Source

<1 %

39

Hidayat Hidayat, Ilu Sulfiyat Parawansa.  
"KORELASI SITOKIN INTERLEUKIN 6 (IL 6)  
DENGAN ADIPONEKTIN PADA PENDERITA  
OBESITAS DENGAN SINDROMA METABOLIK",  
Jurnal Ilmu Kedokteran dan Kesehatan, 2022

Publication

<1 %

40

[adoc.pub](https://adoc.pub)

Internet Source

<1 %

41

[www.nature.com](https://www.nature.com)

Internet Source

<1 %

42

Melisnawati H Angio, Elga Renjana, Linda Wige  
Ningrum, Elok Rifqi Firdiana, Rony Irawanto.  
"Inventory of plants in the Mangrove Botanic  
Garden of Gunung Anyar and their potential  
as medicinal plants", Jurnal Penelitian  
Kehutanan Wallacea, 2022

Publication

<1 %

43

Waenly M. Tumanduk, Jeini E. Nelwan, Afnal  
Asrifuddin. "Faktor-faktor risiko hipertensi  
yang berperan di Rumah Sakit Robert Wolter  
Mongisidi", e-CliniC, 2019

Publication

<1 %

44	<a href="http://docobook.com">docobook.com</a> Internet Source	<1 %
45	<a href="http://dragussalim.blogspot.com">dragussalim.blogspot.com</a> Internet Source	<1 %
46	<a href="http://es.scribd.com">es.scribd.com</a> Internet Source	<1 %
47	<a href="http://jurnal.fk.unand.ac.id">jurnal.fk.unand.ac.id</a> Internet Source	<1 %
48	<a href="http://lifestyle.bisnis.com">lifestyle.bisnis.com</a> Internet Source	<1 %
49	<a href="http://pesquisa.bvsalud.org">pesquisa.bvsalud.org</a> Internet Source	<1 %
50	<a href="http://petakulinerjakarta.blogspot.com">petakulinerjakarta.blogspot.com</a> Internet Source	<1 %
51	<a href="http://repository.unika.ac.id">repository.unika.ac.id</a> Internet Source	<1 %
52	<a href="http://www.slideshare.net">www.slideshare.net</a> Internet Source	<1 %
53	Frenky D. Awuy, Diana S. Purwanto, Yanti M. Mewo. "Pengaruh Pemberian Vitamin C Terhadap Kualitas Spermatozoa Yang Terpapar Asap Rokok", Jurnal e-Biomedik, 2021 Publication	<1 %

54

Immanuel Van Donn Batubara, Benny Wantouw, Lydia Tendean. "PENGARUH PAPARAN ASAP ROKOK KRETEK TERHADAP KUALITAS SPERMATOZOA MENCIT JANTAN (MUS MUSCULUS)", Jurnal e-Biomedik, 2013

Publication

&lt;1 %

55

Lapatta Nazlyza. "GAMBARAN HISTOPATOLOGI AORTA TIKUS WISTAR YANG TERPAPAR ASAP ROKOK", Jurnal e-Biomedik, 2014

Publication

&lt;1 %

56

Paramita Septianawati, Hernayanti Hernayanti, Gratiana Ekaningsih W. "PENGARUH EKSTRAK ETANOL DAUN KEMANGI (*Ocimum bacilicum* L.) TERHADAP KADAR  $\beta$ 2 MIKROGLOBULIN, ASAM URAT DAN GAMBARAN HISTOLOGI GINJAL PADA TIKUS PUTIH GALUR WISTAR (*Rattus novergicus* strain Wistar) YANG DIINDUKSI MONOSODIUM GLUTAMAT", Herb-Medicine Journal, 2020

Publication

&lt;1 %

57

Ruth Haryati Butarbutar, Robiyanto Robiyanto, Eka Kartika Untari. "Potensi Ekstrak Etanol Daun Petai (*Parkia speciosa* Hassk.) Terhadap Kadar Superoksida Dismutase (SOD) Pada Plasma Tikus yang

&lt;1 %

# Mengalami Stres Oksidatif", Pharmaceutical Sciences and Research, 2016

Publication

58

Vania E. Laoh, Lydia E. N. Tendean, Grace Turalaki. "Perbandingan antara Pengaruh Olahraga Berlebihan dan Paparan Asap Rokok terhadap Kualitas Spermatozoa Tikus Wistar (Rattus norvegicus)", Jurnal e-Biomedik, 2018

Publication

<1 %

59

Warigit Dri Atmoko, Bambang Purwanto, Sugiarto Sugiarto. "PENGARUH TERAPI N-ASETIL SISTEIN TERHADAP EKSPRESI INTERLEUKIN 17 DAN FIBROSIS INTERSTISIAL PADA MENCIT NEFRITIS LUPUS", Biomedika, 2018

Publication

<1 %

60

[adoc.tips](http://adoc.tips)

Internet Source

<1 %

61

[doku.pub](http://doku.pub)

Internet Source

<1 %

62

[mirrorforest.blogspot.com](http://mirrorforest.blogspot.com)

Internet Source

<1 %

63

[mytradha12.wordpress.com](http://mytradha12.wordpress.com)

Internet Source

<1 %

64

[pusbindiklatren.bappenas.go.id](http://pusbindiklatren.bappenas.go.id)

Internet Source

<1 %

65	<a href="https://repository.unisba.ac.id">repository.unisba.ac.id</a> Internet Source	<1 %
66	<a href="https://www.coursehero.com">www.coursehero.com</a> Internet Source	<1 %
67	<a href="https://www.dapodikindonesia.web.id">www.dapodikindonesia.web.id</a> Internet Source	<1 %
68	<a href="https://www.tandfonline.com">www.tandfonline.com</a> Internet Source	<1 %
69	Friska W. F. Panjaitan, Marie M. Kaseke, George N. Tanudjaja. "GAMBARAN HISTOLOGIK AORTA TIKUS WISTAR DENGAN DIET LEMAK BABI SETELAH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN PEPAYA", JURNAL BIOMEDIK (JBM), 2013 Publication	<1 %
70	<a href="https://materi.co.id">materi.co.id</a> Internet Source	<1 %
71	May Angelina. "Faktor-Faktor yang Berhubungan dengan Hipertensi pada Pengemudi Kopaja di Terminal Kampung Rambutan Jakarta Tahun 2019", Jurnal Kesehatan, 2021 Publication	<1 %
72	Reza Yogaswara, Rudy Hidayat, Muhadi Muhadi, Ikhwan Rinaldi. "Korelasi antara Faktor Reumatoid dan Vascular Cell Adhesion	<1 %

# Molecule-1 pada Pasien Arthritis Reumatoid Tanpa Sindroma Metabolik", Jurnal Penyakit Dalam Indonesia, 2018

Publication

---

---

Exclude quotes      Off

Exclude matches      Off

Exclude bibliography      Off

# Pencegahan Kerusakan Pembuluh Darah akibat Rokok dengan Jintan Hitam

---

## GRADEMARK REPORT

---

FINAL GRADE

**/0**

GENERAL COMMENTS

**Instructor**

---

PAGE 1

---

PAGE 2

---

PAGE 3

---

PAGE 4

---

PAGE 5

---

PAGE 6

---

PAGE 7

---

PAGE 8

---

PAGE 9

---

PAGE 10

---

PAGE 11

---

PAGE 12

---

PAGE 13

---

PAGE 14

---

PAGE 15

---

PAGE 16

---

PAGE 17

---

PAGE 18

---

PAGE 19

---

PAGE 20

---

PAGE 21

---

PAGE 22

---

PAGE 23

---

PAGE 24

---

PAGE 25

---

PAGE 26

---

PAGE 27

---

PAGE 28

---

PAGE 29

---

PAGE 30

---

PAGE 31

---

PAGE 32

---

PAGE 33

---

PAGE 34

---

PAGE 35

---

PAGE 36

---

PAGE 37

---

PAGE 38

---

PAGE 39

---

PAGE 40

---

PAGE 41

---

PAGE 42

---

PAGE 43

---

PAGE 44

---

PAGE 45

---

PAGE 46

---

PAGE 47

---

PAGE 48

---

PAGE 49

---

PAGE 50

---