

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK JINTEN HITAM
(*Nigella Sativa*) TERHADAP KADAR GSH PARU DAN
GSH HEPAR TIKUS WISTAR YANG
DIPAPAR ASAP ROKOK**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

TKD 02/06

Kho
P



SITI KHOTIMAH

**PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2005**



**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK JINTEN HITAM
(*Nigella Sativa*) TERHADAP KADAR GSH PARU DAN
GSH HEPAR TIKUS WISTAR YANG
DIPAPAR ASAP ROKOK**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

TESIS

Untuk memperoleh Gelar Magister
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga



Oleh:

**SITI KHOTIMAH
NIM 090314984 / M**

**PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2005**

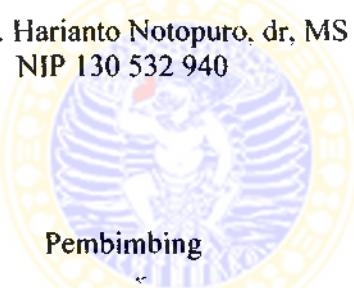
LEMBAR PENGESAHAN

**TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL, 6 Januari 2006**

Oleh

Pembimbing ketua

Prof. Dr. Harianto Notopuro, dr, MS
NIP 130 532 940



Pembimbing

Edhi Rianto, dr, MS
NIP 130 676 010

Mengetahui

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga



Retno Handajani, dr, MS, PhD
NIP 130 541 984

Tesis ini telah diuji dan dinilai oleh panitia penguji
Pada tanggal, 26 September 2005

PANITIA PENGUJI:

Ketua : Prof. Soetjipto, dr, MS, PhD

Anggota : 1. Prof. Dr. Harianto Notopuro, dr, MS

2. Edhi Rianto, dr, MS

3. V. Pikanto Wibowo, dr, SpBK

4. Dr. Arief Wibowo, dr, MS



LEMBAR PENGESAHAN

**TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL, 6 Januari 2006**

Oleh

Pembimbing Ketua

**Prof. Dr. Harianto Notopuro, dr, MS
NIP 130 532 940**



**Edhi Rianto, dr, MS
NIP 130 676 010**

PENGUJI:

1. Prof. Soetjipto, dr, MS, PhD
2. V. Pikanto Wibowo, dr, SpBK
3. Dr. Arief Wibowo, dr, MS

Tanda Tangan

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadirat Allah SWT, yang telah melimpahkan rahmat, karunia dan petunjuk-Nya kepada penulis, sehingga dapat menyelesaikan penelitian/tesis ini. Penelitian ini tidak akan selesai tanpa bantuan dan bimbingan berbagai pihak, sehingga sudah selayaknya penulis dengan tulus ingin menyampaikan rasa terima kasih yang sedalam-dalamnya.

Dengan segala ketulusan hati penulis sampaikan terima kasih yang tak terhingga dan penghargaan setinggi-tingginya kepada Prof. Dr. Harianto Notopuro, dr, MS selaku pembimbing ketua dan dr Edhi Rianto, MS selaku pembimbing atas semua jerih payah beliau dalam membimbing, memberikan masukan-masukan, bekal pengetahuan serta dorongan semangat yang tiada henti-hentinya dengan penuh kesabaran sejak usulan penelitian, persiapan penelitian hingga selesaiya penulisan tesis ini.

Ucapan terima kasih yang sedalam-dalamnya penulis sampaikan juga kepada Dr. Arief Wibowo, dr, MS yang telah banyak membantu kami dalam bidang statistik.

Menyadari bahwa tesis ini tidak mungkin terwujud tanpa bantuan dan peran serta berbagai pihak maka perkenankan penulis dengan setulus hati mengucapkan terima kasih kepada Yth :

Rektor Universitas Airlangga, Prof. Dr. Med Puruhito, Sp. BTKV; direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof. Dr. H. Muhammad Amin; Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof. Retno Handayani, dr, MS, PhD; Kepala Laboratorium Ilmu Biokimia, Prof. Soetjipto, dr, MS, PhD atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk mengikuti pendidikan di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Rektor Universitas Mulawarman dan Ketua Program Studi Kedokteran Umum Universitas Mulawarman Samarinda yang telah memberi ijin kepada penulis untuk belajar di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Kepala Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya beserta seluruh staf yang telah memberikan ijin dan bantuan kepada penulis untuk menggunakan sarana serta fasilitas laboratoriumnya selama penulis melakukan penelitian.

Kepada suamiku tercinta dr. Marwan, Mkes yang senantiasa memberikan bantuan dan dorongan semangat baik di kala senang maupun susah, putra-putriku tersayang Asma' Th. Zahrah, Usamah J. Rabbani, Himmatal Ulya Firdausi dan Sabrina R. Izzati, serta seluruh anggota keluarga yang telah banyak berkorban, memberikan dorongan, doa restu sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini.

Teman-temanku tersayang dr. Hairrudin dan drg. Syamsulina Revianti, penulis sampaikan juga terima kasih yang sedalam-dalamnya atas masukan, kritikan, bantuan yang selalu diberikan kepada penulis selama proses pembuatan tesis ini.

Akhirnya penulis menyadari bahwa hasil penulisan tesis ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu saran dan masukan yang berharga sangat penulis harapkan, agar nantinya tulisan ini dapat bermanfaat bagi upaya pengembangan keilmuan dan kesehatan di Indonesia. Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan rahmat dan karunia-Nya kepada kita semua.

Surabaya, Januari 2006

RINGKASAN

Asap rokok mengandung sangat banyak radikal bebas yang dapat menyebabkan terjadinya stres oksidatif di paru, hepar dan organ lainnya. Kondisi stres oksidatif tersebut berkaitan dengan patogenesis beberapa macam penyakit kronis seperti kanker hepar, penyakit paru obstruktif menahun dan lainnya. Penelitian tentang jinten hitam menunjukkan adanya potensi antioksidan.

Tujuan penelitian ini adalah membuktikan bahwa ekstrak jinten hitam dapat meningkatkan kadar GSH paru dan GSH hepar tikus wistar yang dipapar asap rokok. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *Post Test Only Control Group Design*. Tiga puluh ekor tikus wistar dibagi menjadi 5 kelompok. Kelompok pertama adalah kontrol negatif (tanpa perlakuan). Kelompok kedua adalah kontrol positif (dipapar asap rokok). Kelompok ketiga adalah grup A (dipapar asap rokok dan diberi ekstrak jinten hitam dosis 0.6 gr/kgBB/hari). Kelompok keempat adalah grup B (dipapar asap rokok dan diberi ekstrak jinten hitam dosis 1.2 gr/kgBB/hari). Kelompok kelima adalah grup C (dipapar asap rokok dan diberi ekstrak jinten hitam dosis 2.4 gr/kgBB/hari). Paparan asap rokok diberikan sehari dua kali selama 1 bulan. Kadar GSH diukur dengan metode dari Ellman.

Hasilnya, kadar GSH paru kontrol negatif (0.80778 ± 0.10218 umol/100 mg jar) dan kontrol positif (0.08980 ± 0.057562 umol/100 mg jar). Pada kelompok A, B dan C berturut-turut adalah (0.14575 ± 0.12619 umol/100 mg jar), (0.36760 ± 0.11998

SUMMARY

The Influence of Black Seed's Extract on Glutathione Levels in Lung and Liver of Wistar Rat Which were Exposed to Cigarette Smoke.
Khotimah., S. Postgraduate Program of Airlangga University

Cigarette smoke contains free radicals that can generate oxidative stress of lung, liver and other organs in the body. The oxidative stress itself has a relationship with the pathogenesis of some chronic diseases such as cancer and chronic obstructive pulmonary disease. Black seed studies showed that it has potential antioxidant activity.

The aim of this research was to prove that black seed extract can increase GSH levels in Lung and Liver of wistar rat that were exposed to cigarette smoke. The research design used in this research was The Post Test Only Control Group Design, involving Thirty (30) wistar rats divided into five groups. The first group was negative control group (without any treatment), the second group was positive control group (only exposed to cigarette smoke), the third group was the A group (exposed to cigarette smoke and the black seed's extract in a dose of 0.6 gr/kilograms body weight), the fourth group was the B Group (exposed to cigarette smoke and the black seed's extract in a dose of 1.2 gr/kilograms body weight), and the last group was the C Group (exposed to cigarette smoke and the black seed's extract in dose of 2.4 gr/kilograms body weight). The exposure of cigarette smoke was given twice daily for a month. The GSH levels of the lung and liver tissues were measured by Ellman method.

Result: The levels of lung's GSH/100 mg wet tissue were 0.80778 ± 0.10218 umol, 0.08980 ± 0.057562 umol, 0.14575 ± 0.12619 umol, 0.36760 ± 0.11998 umol and 0.33261 ± 0.11284 umol for the first, second, A, B and C groups, respectively. The GSH levels of the second group was significantly lower than that in the first group. The GSH levels of the B and C groups were significantly higher than in the second group, but it was not observed in the A group. The levels of liver GSH /100 mg wet tissue were 1.62237 ± 0.050554 umol, 0.88356 ± 0.10300 umol, 1.17732 ± 0.06313 umol, 1.18912 ± 0.083093 umol, 1.33379 ± 0.046128 umol for the first, second, A, B and C groups, respectively. The GSH levels of the second group was significantly lower than that in the first group. The GSH levels of the A, B and C groups were significantly higher than that in the second group. All of the data were analyzed by manova and *Tukey HSD test*.

The result of this research indicate that the extract of black seed can increase GSH levels in lungs and liver of wistar rat which were exposed to cigarette smoke.

ABSTRACT

The Influence of Black Seed's Extract for on Glutathione Levels in Lung and Liver of Wistar Rat which were Exposed to Cigarette Smoke.

Khotimah., S. Postgraduate Program of Airlangga University

Abstract. Cigarette smoke contains free radicals or oxidants, that can generate oxidative stress of lungs, liver and the other organs in the body. The black seed studies was showed that it has potential antioxidant activity.

The aim of this research was to prove that black seed extract can increase GSH levels in Lung and Liver of wistar rat which were exposed to cigarette smoke. **Method:** Experimental study with *post test only control group design*. The thirty (30) wistar rats divided into five groups. The first group was a negative control group (without any treatment), the second group was positive control group (only exposed to cigarette smoke), the third group was the A group (exposed to cigarette smoke and black seed's extract in dose of 0.6 gr/kilograms body weight), the fourth group was the B Group (exposed to cigarette smoke and black seed's extract in dose of 1.2 gr/kilograms body weight), and the last group was the C Group (exposed to cigarette smoke and black seed's extract in dose of 2.4 gr/kilograms body weight). The exposure of cigarette smoke was given twice daily for a month. The GSH levels of the lung and liver tissues were measured by Ellman method. **Result :** All of the data were analyzed by manova and Tukey HSD test. The levels of lung's GSH/100 mg wet tissue were 0.80778 ± 0.10218 umol, 0.08980 ± 0.057562 umol, 0.14575 ± 0.12619 umol, 0.36760 ± 0.11998 umol and 0.33261 ± 0.11284 umol for the first, second, A, B and C groups, respectively. The GSH levels of the second group was significantly lower than that in the first group. The GSH levels of the B and C groups were significantly higher than that in the second group, but it was not observed in the A group. The levels of liver GSH /100 mg wet tissue were 1.62237 ± 0.050554 umol, 0.88356 ± 0.10300 umol, 1.17732 ± 0.06313 umol, 1.18912 ± 0.083093 umol, 1.33379 ± 0.046128 umol for the first, second, A, B and C groups, respectively. The GSH levels of the second group was significantly lower than that in the first group. The GSH levels of the A, B and C groups were significantly higher than that in the second group and the C group had the highest value, closely to the normal condition. **Conclusion:** The black seed's extract can increase GSH levels of lungs and liver of wistar rat which were exposed to cigarette smoke.

Key word: Black Seed's extract, cigarette smoke, lung GSH, liver GSH.

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan.....	i
Sampul Dalam.....	ii
Persetujuan.....	iii
Penetapan Panitia.....	iv
Pengesahan.....	v
UCAPAN TERIMAKASIH.....	vi
RINGKASAN.....	viii
SUMMARY.....	x
ABSTRACT.....	xii
Daftar isi.....	xiii
Daftar Gambar.....	xv
Daftar Lampiran.....	xvi
Daftar Singkatan.....	xvii
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	7
1.3 Tujuan.....	8
1.4 Manfaat.....	8
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1 Asap Rokok Sumber Oksidan.....	10
2.2 Stres Oksidatif.....	12
2.3 Paru	17
2.4 Hepar.....	20
2.5 Gluthatione.....	25
2.6 Jinten Hitam (<i>Nigella Sativa</i>) Sebagai Antioksidan.....	29
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....	36
3.1 Kerangka Konseptual.....	36
3.2 Bagan Kerangka Konseptual	39
3.3 Hipotesis Penelitian.....	40
BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN.....	41
4.1 Rancangan Penelitian.....	41
4.2 Populasi Dan Sampel.....	43
4.3 Variabel Penelitian.....	44
4.4 Definisi Operasional.....	44
4.5 Tempat Dan Waktu Penelitian.....	45

4.6 Bahan Dan Alat Penelitian.....	48
4.7 Cara Kerja.....	52
4.8 Analisis Data.....	53
BAB 5 HASIL PENELITIAN.....	54
5.1 Hasil Uji Statistik Deskriptif.....	54
5.2 Hasil Uji Multivariat Anova dan Tukey HSD	56
BAB 6 PEMBAHASAN.....	59
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN.....	65
7.1 Kesimpulan.....	65
7.2 Saran.....	65
DAFTAR PUSTAKA.....	66
LAMPIRAN.....	71



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 : Asap Rokok Sumber Oksidan.....	10
Gambar 2.2 : Kerusakan paru akibat stres oksidatif	13
Gambar 2.3 : Struktur skematis alveoli manusia.....	18
Gambar 2.4 : Proses Detoksifikasi Hepar.....	22
Gambar 2.5 : Proses Konjugasi Oleh Gluthatione.....	23
Gambar 2.6 : Struktur glutathion dan glutathion disulfid.....	25
Gambar 2.7 : Siklus Redoks GSH.....	27
Gambar 2.8 : Biji jinten hitam.....	30
Gambar 2.9 : Struktur molekul thymoquinon.....	31
Gambar 5.1 : Grafik pemeriksaan kadar GSH paru dan hepar.....	54



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 : Perhitungan dosis jinten hitam.....	69
Lampiran 2 : Jadwal kegiatan penelitian.....	70
Lampiran 3 : Rincian biaya penelitian.....	71
Lampiran 4 : Komposisi pakan tikus.....	72
Lampiran 5 : Cara perfusi paru dan hepar in situ.....	73
Lampiran 6 : Komposisi larutan perfusi.....	74
Lampiran 7 : Preparasi jaringan paru	75
Lampiran 8 : Preparasi jaringan hepar.....	76
Lampiran 9 : Hasil analisis statistik.....	77



DAFTAR SINGKATAN

BSO	: buthionine sulfoximine
DNA	: deoxyribonucleic acid
ELF	: epithelial lining fluid
GSH	: glutathione
GSSG	: glutathione disulfida
GST	: glutathione S-transferase
GPx	: glutathione peroxidase
GR	: glutathione reductase
PAHs	: polycyclic aromatic hydrocarbon
ROS	: reactive oxygen spesies
TBHQ	: ter-butyl-hidroquinone



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Berbagai usaha dilakukan orang guna mengurangi risiko akibat rokok diantaranya adalah kampanye anti rokok dan mengurangi ruang gerak para perokok dengan cara memperbanyak tempat-tempat bebas asap rokok. Akan tetapi dalam kenyataannya jumlah perokok masih sangat banyak. Di negara-negara berkembang 57% dari seluruh laki-laki adalah perokok dan di negara-negara industri 29% dari seluruh laki-laki adalah perokok. Di Indonesia sendiri menurut hasil survei dari WHO pada tahun 1990, ternyata 75% pria Indonesia dan 15% wanita Indonesia adalah perokok (Crofton, 1990).

Telah banyak diketahui bahwa terdapat hubungan erat antara rokok dengan terjadinya kanker, beberapa penelitian terakhir memperlihatkan hubungan antara rokok dengan kejadian kanker hepar (Yuan, 1996; Cerhan, 1998; Mitacek, 1999). Salah satu teori yang menjelaskan proses keganasan tersebut adalah teori radikal bebas, yaitu radikal bebas menyebabkan dehidrosilasi basa yang berakibat rusaknya *deoxyribo nucleic acid* (DNA) *strand* sehingga terjadi perubahan fungsi sel, keganasan atau kematian sel (Yuan, 1996; Cerhan, 1998; Mitacek, 1999). Paparan asap rokok terbukti pula dapat meningkatkan aktifitas radikal bebas pada beberapa sel tubuh seperti membran sel endotel pembuluh darah, sel hepar, epitel paru, lensa mata dan neuron (Halliwel, 1987).



Asap rokok juga diketahui berhubungan erat dengan patogenesis berbagai kelainan paru seperti karsinoma paru, PPOM (penyakit paru obstruktif menahun), asma bronkhiale dan fibrosis paru. Diduga, kelainan paru tersebut berhubungan dengan adanya ketidakseimbangan antara oksidan dan antioksidan di dalam tubuh sehingga mengakibatkan terjadinya kondisi stres oksidatif (Widodo, 1996).

Stres oksidatif adalah kondisi gangguan keseimbangan antara oksidan dan antioksidan yang berpotensi menimbulkan kerusakan (Sies, 1991). Stres oksidatif dapat timbul karena konsumsi alkohol, trauma, kedinginan, pengobatan, bahan-bahan toksin, radiasi, polusi udara serta asap rokok (MacNee, 1999; Kelly, 2003).

Asap rokok mengandung radikal bebas dalam jumlah yang sangat tinggi. Dalam satu kali hisap, diperkirakan sebanyak 10^{14} molekul radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh. Walaupun radikal bebas tersebut berumur pendek, namun radikal quinon dapat mencapai paru (Church and Prior, 1985). Hydroquinone/quinone dalam tar dapat menembus paru, berdifusi pada membran sel dan ikut dalam reaksi redoks yang terjadi di ekstraseluler dan intraseluler sehingga akan membentuk senyawa semiquinone, hidrogen peroksida (H_2O_2) serta radikal anion superoksid ($O_2^{\bullet-}$), dan selanjutnya dapat memicu terbentuknya radikal hidroksil ($\bullet OH$) yang sangat berbahaya oleh karena sangat reaktif dan dapat menyebabkan kerusakan membran sel, protein dan DNA (Halliwel, 1999, Favier, 1995).

Asap rokok mengandung aldehid, khususnya akrolein, asetaldehid dan formalin yang dapat menyebabkan penurunan *gluthatione* (GSH) dan modifikasi gugus protein –SH dan –NH₂ di sel (Halliwel, 1999). Akrolein pada dosis besar dapat bersifat toksik terhadap sel bahkan lebih jauh bisa bersifat genotoksik dan mutagenik. Hal ini

berhubungan dengan reaktifitas akrolein dengan gugus asam amino sistein, histidin dan lisin dari protein serta dengan sisi nukleofilik DNA (Kehrer & Biswal, 2000).

GSH merupakan tripeptida penting yang berada di ruang intrasel maupun ekstrasel dan mengandung gugus sulfhidril (-SH) yang mampu melindungi sel terhadap oksidan, komponen elektrofilik dan bahan xenobiotik. Berdasarkan fungsinya GSH dapat berperan sebagai antioksidan, antitoksin dan kofaktor penting dari beberapa enzim. Hati merupakan organ tubuh yang paling utama dalam proses detoksifikasi bahan xenobiotik. Dan kandungan GSH di dalam hati paling besar di antara organ-organ lain. Selain itu GSH berperan penting selama proses detoksifikasi oleh hati (Kidd P.M, 1997). Selain hati, GSH juga banyak terdapat di paru. Di dalam *epithelial lining fluid* (ELF) kandungan GSH mencapai lebih dari 100 kali lipat GSH plasma. Hal ini karena paru merupakan organ yang selalu terpapar dengan bahan polutan secara terus menerus (Rahman & MacNee, 2000).

Sistem redoks GSH mempunyai peranan yang penting dalam mempertahankan homeostasis GSH intraseluler. Di dalam sistem ini dibutuhkan GSH sebagai substrat dalam proses detoksifikasi senyawa peroksida seperti hidrogen peroksida (H_2O_2) ataupun lipid peroksid menjadi senyawa yang tidak berbahaya dengan melibatkan enzim glutathion peroksidase (MacNee,1999). Dengan adanya proses detoksifikasi yang melibatkan GSH tersebut, maka dapat dicegah terbentuknya $\cdot OH$ yang berbahaya bagi komponen sel. Apabila radikal hidroksil ($\cdot OH$) masih terbentuk, maka GSH masih dapat meredamnya (Suryohudoyo, 2000). Sehingga tampak jelas peranan penting GSH sebagai antioksidan baik intrasel maupun ekstraseluler.

Paparan asap rokok akut menyebabkan penurunan kadar GSH dan penurunan aktivitas *gluthatione peroxidase* serta *glucose-6 phosphate dehydrogenase* (G6PD) di sel alveolar tipe II, eritrosit serta di *epithelial lining fluid* (ELF). Sebaliknya, paparan asap rokok kronis menyebabkan peningkatan kadar GSH serta aktivitas enzim-enzim tersebut. Namun, peningkatan ini tidak adekuat melindungi sel-sel tersebut terhadap paparan oksidan pada perokok kronis (Aoshiba, 2003).

Paparan akut asap rokok (*side-stream cigarette smoke*) menyebabkan peningkatan produk dari stres oksidatif DNA jantung, hepar dan paru tikus, hal ini ditandai dengan peningkatan *8-hydroxy-2-deoxyguanosine* (8-OHdG) di organ-organ tersebut (Howard DJ dkk, 1997).

Paparan dengan nikotin, yang merupakan komponen toksik utama dalam asap rokok terbukti dapat menyebabkan stres oksidatif di organ paru, hati dan ginjal dari tikus wistar. Ini berdasarkan percobaan yang dilakukan oleh Kalpana dan Menon (2004) bahwa injeksi nikotin 2,5 mg/KgBB selama 22 minggu menyebabkan penurunan kadar GSH, aktifitas enzim superoksid dismutase dan katalase serta peningkatan kadar *malondialdehyde* di organ-organ tersebut (Kalpana Ch. & Menon V.P, 2004).

Penjelasan diatas menunjukkan bahwa paparan asap rokok berhubungan erat dengan berbagai macam penyakit di beberapa organ tubuh seperti paru dan hepar. Hal ini karena asap rokok mengandung banyak radikal bebas dan bahan toksin yang dapat menyebabkan penurunan sistem antioksidan sehingga dapat menimbulkan kondisi stres oksidatif di organ-organ tersebut. Dan ada dugaan bahwa stres oksidatif sangat berkaitan dengan patogenesis berbagai macam penyakit.

Dalam pengobatan pada abad 21 ini dikembangkan obat-obat baru yang berasal dari tanaman di seluruh negara di dunia (Aditama, 2000). Angka statistik menunjukkan di tahun 1994 sekitar 28,4 % masyarakat perkotaan mengobati sendiri penyakit yang dideritanya dengan jamu-jamu tradisional dan angka ini meningkat menjadi 35,4% di tahun 1995 (BPS, 1996).

Jinten hitam (*Nigella sativa*) merupakan tanaman tertua yang digunakan dalam pengobatan secara alami. Tanaman ini banyak tumbuh di daerah Mediterania, Yunani, Eropa, Timur tengah dan Asia termasuk Indonesia (Al Jassir, 1992; Kasule, 2000; Avicena, 2000). Sesuai dengan budaya masing-masing, penggunaan jinten hitam berbeda-beda di masing-masing negara. Di Amerika digunakan untuk influenza, asma, batuk dan untuk meningkatkan sistem imun. Pada pengobatan arab tradisional, jinten hitam secara sendiri atau dikombinasi dengan madu untuk mengobati asma bronkhial (Boskabody, 2002).

Bagian tanaman ini yang sering digunakan untuk pengobatan adalah bijinya. Jinten hitam mengandung lebih dari 100 nutrisi berharga. Sedangkan kandungan aktifnya adalah *thymoquinone*, *nigellone* dan minyak padat (Al Jassir, 1997; Basir, 1998).

Burits dan Bucar (2000) dengan menggunakan kromatografi lapis tipis dua dimensi menguji minyak esensial dari jinten hitam dan mendapatkan bahwa kandungannya berupa *thymoquinone*, *carvacrol*, *t-anethole* dan *4-terpineol* mempunyai kemampuan *radical scavenging*. Komponen-komponen yang dikandung oleh jinten hitam tersebut mempunyai kemampuan *OH radical scavenging* yang efektif pada peroksidasi lipid nonenzimatis dan degradasi *deoxyribose*. Badary dkk

(2003) melakukan penelitian untuk menguji efek antioksidan thymoquinon dan *terbutylhidroquinone* (TBHQ) secara *in vitro*. Kedua bahan tersebut terbukti mampu menghambat peroksidasi lipid mikrosomal. Selain itu terbukti bahwa thymoquinon lebih aktif berperan sebagai *superoxide anion scavenger* daripada TBHQ.

Penelitian yang dilakukan oleh Badary dkk (2001) mendapatkan hasil adanya kemampuan antitumor thymoquinon pada tikus Swiss albino yang diinduksi oleh *20-methylcholanthrene* (MC). Pada tikus yang dinduksi dengan MC didapatkan akumulasi peroksidita lipid, penurunan GSH dan juga penurunan aktivitas *gluthatione S-transferase* (GST) dan *quinone reductase* (QR) dari jaringan hepar, sedangkan pada tikus yang mendapat perlakuan induksi MC dan thymoquinon di dapatkan akumulasi peroksidita lipid yang lebih rendah dibanding yang hanya mendapat induksi MC. Kadar GSH serta aktivitas GST juga lebih tinggi dibanding yang hanya diinduksi dengan MC (Badary, 2001).

Shoker melakukan penelitian tentang peranan thymoquinon murni terhadap penanganan penyakit *experimental allergic encephalomyelitis* pada tikus model. Pada penelitian tersebut diinjeksikan 1mg/kg thymoquinon melalui vena ekor. Hasilnya adalah thymoquinon tersebut dapat menghambat stres oksidatif yang terjadi pada penyakit *experimental allergic encephalomyelitis*. Hal itu ditandai dengan meningkatnya kadar GSH di jaringan *medulla spinalis* tikus yang mendapat thymoquinon tersebut (Shoker, 2003).

Melihat hasil-hasil penelitian diatas, dapat digarisbawahi beberapa hal. Pertama, paparan asap rokok menyebabkan stres oksidatif di jaringan paru dan hepar yang

ditandai dengan adanya penurunan sistem antioksidan. *Kedua*, adanya potensi proteksi jinten hitam terhadap kondisi stres oksidatif di beberapa sistem organ.

Oleh karena itu, adalah menarik untuk meneliti potensi protektif jinten hitam terhadap stres oksidatif di paru dan hepar yang terpapar dengan asap rokok. Penelitian potensi proteksi jinten hitam terhadap oksidan secara *in vivo* pada hewan coba belum banyak dilakukan. Jaringan paru dipilih karena pada perokok, paru termasuk organ yang paling banyak mendapat paparan radikal bebas yang berasal dari asap rokok, sedangkan jaringan hepar diteliti karena selain merupakan tempat utama untuk metabolisme tubuh khususnya dalam proses detoksifikasi bahan xenobiotik, kandungan bahan toksin dalam asap rokok diketahui dapat menimbulkan kerusakan di organ tersebut. Parameter yang diukur adalah kadar GSH jaringan paru dan hepar. Hal ini karena GSH merupakan antioksidan yang utama baik di paru maupun di hepar yang berperan dalam perlindungan sel terhadap aktifitas oksidan (Rahman & MacNee, 1999, Kidd PM, 1997). Selain itu GSH berperan penting dalam proses detoksifikasi bahan berbahaya di dalam hati.

1. 2 Rumusan Masalah

Masalah yang dapat dirumuskan dari latar belakang di atas adalah :

1. Apakah pemberian ekstrak jinten hitam dapat meningkatkan kadar GSH di paru tikus wistar yang dipapar asap rokok?
2. Apakah pemberian ekstrak jinten hitam dapat meningkatkan kadar GSH di hepar tikus wistar yang dipapar asap rokok?

1.3 Tujuan

1. Membuktikan bahwa pemberian ekstrak jinten hitam dapat meningkatkan kadar GSH di paru tikus wistar yang dipapar asap rokok.
2. Membuktikan bahwa pemberian ekstrak jinten hitam dapat meningkatkan kadar GSH di hepar tikus wistar yang dipapar asap rokok.

1.4 Manfaat

1. Menambah khazanah ilmu pengetahuan kedokteran khususnya tentang obat-obatan.
2. Menjadi dasar ilmiah pengembangan jinten hitam menjadi pengobatan alternatif terhadap stres oksidatif.
3. Menjadi dasar ilmiah pengembangan pengobatan dengan menggunakan bahan-bahan alamiah.

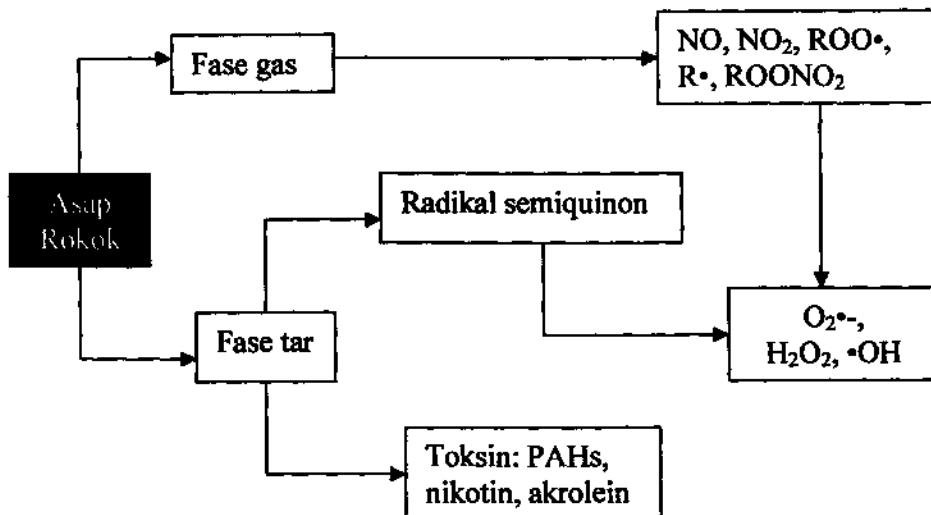
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Asap Rokok Sumber Oksidan

Asap rokok mengandung lebih dari 4000 macam bahan-bahan kimia yang merupakan campuran antara gas, partikel, dan cairan dengan diameter 0,3 IU serta oksidan, seperti tampak pada gambar 2.1. 400 diantaranya beracun dan kira-kira 43 senyawa yang bersifat karsinogenik (Aditama, 2001). Gas dalam asap rokok adalah CO, nitrogen dioksida, akrolein, ammonia, hidrogen sianida, hidrogen sulfida, formaldehida yang dapat menimbulkan batuk, bronkhospasme, hipersekresi mukus, berhentinya gerakan silia dan bronkiolitis hebat. Partikel di dalam asap rokok meliputi nikotin, tar, cadmium, polonium 210 dan nikel (Hambali, 1987).

Asap rokok merupakan oksidan inhalan yang terdiri dari campuran gas dan partikel, dimana setiap hembusan asap rokok mengandung 10^{14} molekul radikal bebas, disamping itu juga mengandung 800 ppm nitrogen oksida yang dapat bereaksi dengan olefin dari asap rokok (Rahman, 1999).

Tar terbentuk selama pemanasan tembakau. Tar adalah hidrokarbon aromatik polisiklik yang terdapat dalam asap rokok dan merupakan senyawa yang karsinogenik. Kadar tar yang terkandung dalam asap rokok inilah yang berhubungan dengan risiko timbulnya kanker (Sumintarti, 1997). Dalam tar bila diidentifikasi kandungannya dengan menggunakan kromatografi akan didapatkan naftilamin,



Gambar 2.1 Asap rokok sumber radikal bebas
(Dimodifikasi: Repine, 1997)

pyrene, benzo(a)pyrene, urethane, dibenzacridine, cadmium dan dimethyl nitrosamine yang bersifat karsinogenik. Bahan-bahan karsinogen ini dapat memicu terbentuknya senyawa *reactive oxygen species* (ROS) dalam tubuh.

Aldehida, khususnya akrolein, asetaldehida dan formalin dapat menyebabkan depresi GSH dan modifikasi grup protein –SH dan –NH₂. Hidroquinon/quinon dalam tar dapat menembus paru, berdifusi pada membran sel dan ikut dalam reaksi redoks yang terjadi di ekstraseluler dan intraseluler sehingga akan membentuk senyawa semiquinon, H₂O₂ serta O₂ – (Haliwell, 1999). Akrolein pada dosis besar dapat bersifat toksik terhadap sel bahkan lebih jauh bisa bersifat genotoksik dan mutagenik. Hal ini berhubungan dengan reaktifitas akrolein dengan gugus asam amino sistein, histidin dan lisin dari protein serta dengan sisi nukleofilik DNA (Kehrer & Biswal, 2000).

Nikotin adalah alkaloid toksik yang terdapat dalam tembakau. Banyak sigaret berisi kira-kira 8-9 mg nikotin dan perokok umumnya mendapatkan kira-kira 1-3 mg nikotin/batang. Nikotin diabsorbsi melalui paru-paru dengan kecepatan yang sama dengan masuk melalui intravena (Sumintarti, 1999). Nikotin dapat menyebabkan penurunan dari sistem antioksidan tubuh (Kalpana, 2004).

Karbon monoksida merupakan gas beracun yang tidak berwarna. Kandungannya di dalam asap rokok adalah 2 – 6 %. Karbon monoksida dari asap rokok masuk ke dalam darah melalui alveoli paru. Karbon monoksida memiliki afinitas dengan hemoglobin (Hb) sekitar 200 kali lebih kuat dibanding afinitas oksigen terhadap hemoglobin. Sebanyak 10 % dari seluruh Hb dapat terisi oleh karbon monoksida dalam bentuk COHb (*Carboxy hemoglobin*) yang berakibat sel darah merah akan kekurangan oksigen. Keadaan kekurangan oksigen dapat menyebabkan terbentuknya ROS jika diberi reperfusi oksigen (Siregar, 1992)

Asap rokok selain mengandung radikal bebas, juga mengandung substansi yang dapat memicu terbentuknya radikal bebas dalam tubuh. Substansi itu antara lain dimetilnitrosamin dan *benzo(a)pyrene* (Haliwell, 1991). Menurut Djamhuri (1991), rokok kretek mengandung komponen yang lebih kompleks dari rokok putih sehingga memiliki kemampuan memicu radikal bebas yang lebih kompleks dibanding rokok putih (Djamhuri, 1991).

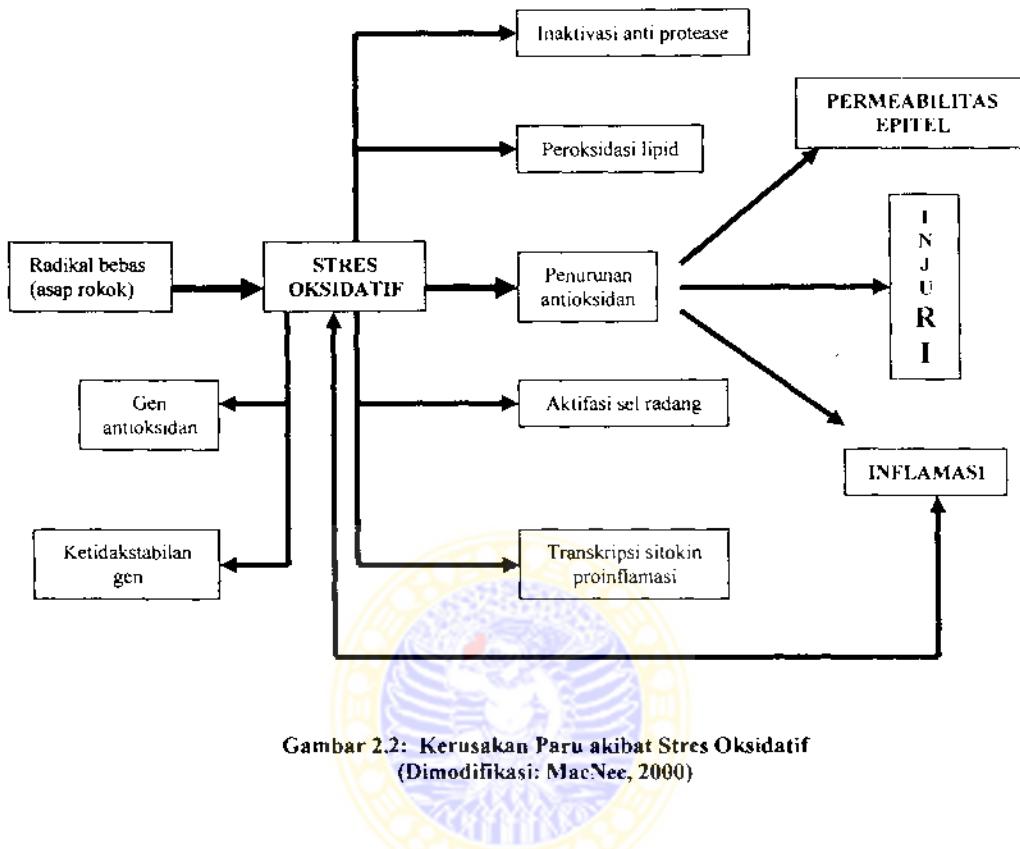
Keberadaan radikal NO (\cdot NO) dalam fase gas asap rokok dapat ditemukan dengan teknik *spin trapping* dengan menggunakan alat *electrical spin resonance* (ESR). Radikal NO dapat terbentuk dari donor \cdot NO seperti kompleks \cdot NO amina dan reaktan lain seperti nitrogen oxide (NOx) (Shinagawa, 1998).

Penelitian dengan menggunakan tikus yang dipapar rokok telah banyak dilakukan. Percobaan yang dilakukan oleh Shapiro dan kawan-kawan menunjukkan bahwa paparan asap rokok selama 3 bulan menyebabkan hilangnya silia pada sel epithel saluran nafas, dan infiltrasi sel-sel radang seperti sel T, makrofag, neutrofil dan eosinofil. Apabila paparan diperpanjang menjadi 6 bulan maka ditemukan obstruksi saluran nafas yang kecil oleh sel-sel radang dan debris dan ditemukan pula sedikit perlengketan alveolar (Shapiro, 2000).

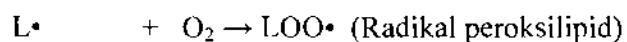
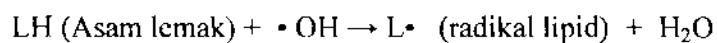
2.2 Stres Oksidatif

Istilah stres oksidatif pertama kali disampaikan oleh Sies pada tahun 1991. Sies dalam bukunya mendefinisikan stres oksidatif sebagai kondisi gangguan keseimbangan antara oksidan dan antioksidan (peningkatan oksidan yang tidak mampu diimbangi oleh antioksidan) yang berpotensi menimbulkan kerusakan. Sejak saat itu banyak definisi lain yang dikemukakan. Hampir semua definisi yang dikemukakan berupaya untuk menjelaskan proses apa saja yang terlibat dalam transfer elektron dari satu molekul ke molekul yang lain dalam konteks biologis. Stres oksidatif antara lain dapat timbul karena konsumsi alkohol, pengobatan, trauma, kedinginan, polusi udara, asap rokok, toksin dan radiasi (Kelly, 2003).

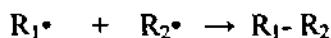
Apabila oksidan yang ada lebih besar daripada antioksidan, maka oksidan tersebut dapat menurunkan sistem antioksidan yang berakibat pada kerusakan komponen-komponen seluler yang penting seperti membran lipid, protein, karbohidrat dan DNA. Konsekuensi patofisiologis ini akan berujung pada inflamasi serta kerusakan jaringan (gambar 2.2) (Comhair, 2002, MacNee, 2000).



Pada membran sel terdapat beberapa struktur penyusun membran sel yang penting, yaitu fosfolipid, glikolipid dan kolesterol. Fosfolipid dan glikolipid mengandung asam lemak tak jenuh (seperti asam linoleat, asam linolenat, dan asam arakidonat) yang sangat rawan terhadap serangan-serangan radikal, terutama radikal hidroksil. Radikal hidroksil dapat menimbulkan reaksi rantai yang dikenal dengan peroksidasi lipid.



Akibat dari reaksi rantai ini adalah terputusnya rantai asam lemak menjadi berbagai senyawa yang bersifat toksik terhadap sel, antara lain adalah berbagai macam aldehid, seperti malondialdehida (MDA), 9-hidroksi-nonenal serta berbagai macam hidrokarbon seperti etana dan pentana. Selain reaksi di atas, dapat terjadi pula ikatan silang antara dua rantai asam lemak atau antara asam lemak dan rantai peptida (protein) yang timbul karena reaksi dua radikal :



Semua reaksi di atas menyebabkan kerusakan yang parah pada membran sel serta membahayakan kehidupan sel (Suryohudoyo, 2000).

Peningkatan peroksida lemak dapat disebabkan asap rokok yang merupakan sumber radikal bebas eksogen yang mengandung 10^{14} molekul radikal bebas dalam setiap hisapnya. Selain itu, asap rokok juga mengandung substansi yang dapat memicu terjadinya peroksida lemak yaitu :

1. *Polycyclic aromatic hidrocarbons* (PHAs)
2. Radikal karbondioksida ($CO_2 \cdot$)
3. Radikal nitrit oksida ($NO \cdot$) dan nitrit dioksida ($NO_2 \cdot$)
4. Besi (Fe^{2+})
5. Semiquinon, quinon dan sebagainya

Bahan-bahan tersebut, khususnya *Polycyclic aromatic hidrocarbons* (PHAs), akan menginduksi sejumlah sitokrom P450 atau sitokrom CYP1A1 dalam sel . Akibatnya terjadi gangguan pada metabolisme fisiologis. Hal ini akan mengaktifasi siklus sitokrom P450 hidroksilase dalam mikrosom dengan merubah NADPH menjadi $NADP^+$ dan elektron bebas. Elektron ini mengakibatkan terjadinya reaksi oksidasi-

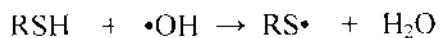
reduksi antara radikal bebas dengan sitokrom P450 untuk menghasilkan radikal superoksida ($O_2^{\cdot-}$) dan hidrogen peroksida (H_2O_2). Adanya ikatan antara $O_2^{\cdot-}$ dengan sitokrom P450 merupakan zat antara dalam pengaktifan oksigen pada reaksi hidroksilasi selanjutnya. Jadi semakin banyak paparan asap rokok yang diberikan akan lebih menginduksi sitokrom P450, dan makin besar pula jumlah $O_2^{\cdot-}$ dan hidrogen peroksida (H_2O_2) yang diproduksi (McKinnon dkk, 1996).

Radikal karbon dioksida (CO_2^{\cdot}) dan semiquinon yang terkandung dalam asap rokok jika berikatan dengan O_2 (metabolisme aerobik) juga akan menghasilkan $O_2^{\cdot-}$. Radikal superoksida ini kemudian akan diubah menjadi H_2O_2 dan apabila berikatan dengan elektron akan menjadi radikal hidroksil, yang mampu memulai terjadinya peroksidasi lemak (Suryohudoyo, 2000).

Radikal Nitrit oksida (NO^{\cdot}) adalah radikal bebas terbanyak dalam asap rokok. NO^{\cdot} ini mudah menyerang molekul yang mempunyai ikatan rangkap ($-C=C-$) dan bereaksi dengan O_2 membentuk nitrogen dioksida (NO_2). NO dan NO_2 dapat bereaksi dengan H_2O_2 untuk membentuk radikal hidroksil (OH^{\cdot}). Radikal hidroksil akan mengabstraksi atom hidrogen dan membuat reaksi propagasi yang menyebabkan terjadinya peroksidasi lemak (Suryohudoyo, 2000).

Selain mengandung besi, asap rokok juga mampu melepaskan besi dari ferritin, sehingga jumlah besi dalam tubuh meningkat. Oksidasi besi (Fe^{2+}) akan menghasilkan elektron, yang akan merubah hidrogen peroksida menjadi radikal hidroksil. Radikal hidroksil yang terbentuk mempunyai kecenderungan kuat meningkatkan kadar peroksidasi lemak dalam jaringan paru.

Oksidan dapat merusak protein karena dapat mengadakan reaksi dengan asam amino yang menyusun protein. Diantara asam amino penyusun protein yang paling rawan adalah sistein. Sistein mengandung gugusan sulfidril (-SH) yang sangat peka terhadap serangan oksidan seperti radikal hidroksil :



Pembentukan ikatan disulfida (S-S) menimbulkan ikatan intra atau antar molekul sehingga protein kehilangan fungsi biologisnya, contohnya adalah enzim kehilangan aktifitasnya (Siregar, 1992; Suryohudoyo, 2000).

Paparan asap rokok akut menyebabkan penurunan kadar GSH dan penurunan aktivitas *gluthatione peroxidase* serta *glucose-6 phosphate dehydrogenase* (G6PD) di sel alveolar tipe II, eritrosit serta di *epithelial lining fluid* (ELF). Sebaliknya, paparan asap rokok kronis menyebabkan peningkatan kadar GSH serta aktivitas enzim-enzim tersebut. Namun, peningkatan ini tidak adekuat melindungi sel-sel tersebut terhadap paparan oksidan pada perokok kronis (Aoshiba, 2003).

Paparan akut asap rokok (*side-stream cigarette smoke*) menyebabkan peningkatan produk dari stres oksidatif DNA jantung, hepar dan paru tikus, hal ini ditandai dengan peningkatan *8-hydroxy-2-deoxyguanosine* (8-OHdG) di organ-organ tersebut (Howard DJ dkk, 1997).

Paparan dengan nikotin, yang merupakan komponen toksik utama dalam asap rokok terbukti dapat menyebabkan stres oksidatif di organ paru, hati dan ginjal dari tikus wistar. Ini berdasarkan percobaan yang dilakukan oleh Kalpana dan Menon (2004) bahwa injeksi nikotin 2,5 mg/KgBB selama 22 minggu menyebabkan

penurunan kadar GSH, aktifitas enzim superoksid dismutase dan katalase serta peningkatan kadar malondialdehid di organ-organ tersebut (Kalpana Ch. % Menon V.P, 2004).

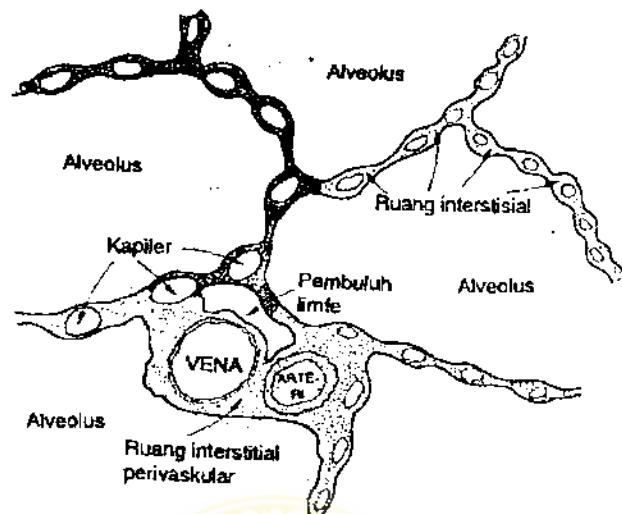
2.3 Paru

Paru manusia terbagi menjadi lobus-lobus oleh invaginasi pleura. Paru kanan terbagi menjadi tiga lobus, sedangkan paru kiri terbagi menjadi dua lobus. Setiap lobus terbagi menjadi segmen-segmen bronkopulmoner oleh septum-septum yang berasal dari permukaan pleura. Masing-masing segmen tersebut memiliki bronkus segmental.

Segmen bronkopulmoner tersebut kemudian terbagi lagi menjadi lobulus-lobulus yang berdiameter 1 cm dan pada umumnya berbentuk pyramidal. Di dalam setiap lobulus tersebut, bronkiolus terminalis menjadi struktur yang disebut acinus. Di dalam struktur acinus tersebut, *bronchioles* menjadi alveoli.

Masing-masing paru terdapat sekitar 300 juta alveoli. Luas seluruh permukaan alveoli tersebut $40 - 80 \text{ m}^2$ (gambar 2.3). Permukaan alveoli tersebut dilapisi oleh sejenis cairan tipis yang disebut *epithelial lining fluid* (ELF). ELF mengandung surfaktan yang merupakan bahan yang penting untuk mempertahankan struktur alveolus. ELF juga mengandung bahan-bahan yang berperan dalam mekanisme pertahanan terhadap polutan yang ikut terhirup saat bernafas. Bahan-bahan itu antara lain antioksidan seperti SOD, katalase dan GSH (Poulter, 1997).

Paru secara konstan terpapar dengan lingkungan, kira-kira lebih dari 10.000 liter udara tiap hari. Seperti traktus gastrointestinal dan urogenital, kondisi di atas



Gambar2. 3: Struktur Skematis Alveolus Paru Manusia
(Sumber: Guyton, 1994)

menyebabkan terpaparnya permukaan epithel mukosa terhadap lingkungan. Bombardir epithel yang terus menerus oleh mikroorganisme, toksin debris dan oksidan tersebut membutuhkan sistem pertahanan yang berlapis untuk mencegah masuknya faktor-faktor yang berpotensi merusak. Pencegahan terhadap bahan asing ke jaringan paru adalah penting, karena masuknya bahan asing tersebut dapat menginduksi respon imun yang pada gilirannya menghasilkan reaksi inflamasi yang merusak dan sering menyebabkan penurunan fungsi vital dari paru (Poulter, 1997).

Paru merupakan organ yang memiliki permukaan epitel yang luas dan senantiasa terpapar oleh polutan udara, asap rokok serta produk-produk dari inflamasi. Untuk meminimalkan kerusakan yang ditimbulkan oksidan terhadap molekul-molekul biologi, paru manusia dilengkapi dengan sistem antioksidan yang terintegrasi antara antioksidan enzimatik dan antioksidan terlarut yang sangat banyak. Sistem ini

termasuk beberapa mekanisme antioksidan untuk mendetoksifikasi produk-produk yang reaktif atau mengkonversinya ke bentuk lain yang akan dieliminasi oleh antioksidan yang lain. Apabila oksidan yang ada sangat besar, maka hal itu akan dapat mengganggu atau menginaktivasi sistem antioksidan yang ada. Konsekwensi patofisiologis hal itu adalah inflamasi dan kerusakan jaringan yang luas (Comhair, 2002). Antioksidan enzimatik yang ada di paru antara lain glutathione, SOD katalase dan GPx (gluthatione peroksidase). Sedangkan yang nonenzimatik seperti α -tocopherol dapat menghentikan peroksidasi lipid dengan menangkap lipid peroksi radikal (LOO°), vitamin C, beta karoten dan lainnya.

Paru mengandung enzim antioksidan intraseluler utama untuk menjaga kondisi redoks yang normal berupa gluthatione (GSH). Rongga alveoli dapat merekrut antioksidan tambahan dari ELF. Di dalam ELF, jumlah GSH 100 kali lebih tinggi daripada di plasma. Lebih dari 90 % GSH di ELF dalam bentuk tereduksi. (Comhair, 2002).

GSH merupakan tripeptida penting (*L- γ -glutamyl-L-cysteinyl-glycine*) yang berada di paru dan mengandung gugus sulfidril (-SH) yang mampu melindungi makrofag alveolar, sel epihtel pulmonal dan sel endothel pulmonal terhadap antioksidan, komponen elektrofilik dan bahan xenobiotik. GSH bisa berada di intraseluler maupun ekstraseluler. Di intrasel, 90 % GSH merupakan protein non thiol dan merupakan agen pereduksi kunci sehingga berakibat pada modulasi imun serta kondisi inflamasi. Perubahan kadar GSH di ELF telah dilaporkan banyak terjadi pada berbagai kondisi inflamasi. Misalnya terjadi penurunan kadar GSH di ELF pada penyakit *idiopathic*

pulmonary fibrosis, acute respiratory syndrome, cystic fibrosis dan pasien HIV (Rahman, 1999).

Penurunan kadar GSH pada perokok dan penderita PPOM terjadi karena asap rokok merupakan bahan yang bersifat xenobiotik dan juga mengandung 10^{14} radikal bebas dalam setiap kali hisap. Di dalam asap rokok juga terdapat aldehid, khususnya akrolein, asetaldehid dan formalin yang dapat menyebabkan penurunan GSH dan modifikasi grup protein –SH dan –NH₂ (Rahman, 1999).

2.4 Hepar

Hepar merupakan organ paling besar di dalam tubuh dengan berat kurang lebih 1,5 kg. Terdiri dari dua lobus yaitu lobus kanan dan lobus kiri, lobus kanan lebih besar dari lobus kiri. Lobus-lobus tersebut merupakan unit fungsional dari hepar. Masing-masing lobus mengandung kurang lebih satu juta lobuli yang terdiri dari sel hepar berbentuk heksagonal yang disebut hepatosit. Hepatosit mensekresi empedu dan bahan metabolit lain ke saluran empedu. Di antara hepatosit terdapat ruang-ruang yang disebut dengan sinusoid. Di dalam sinusoid terdapat sel Kupffer, sel fagosit yang memfagosit sel darah merah tua, bakteri dan partikel asing dari darah, serta mendetoksifikasi toksin dan bahan berbahaya lain (Ganong, 1999).

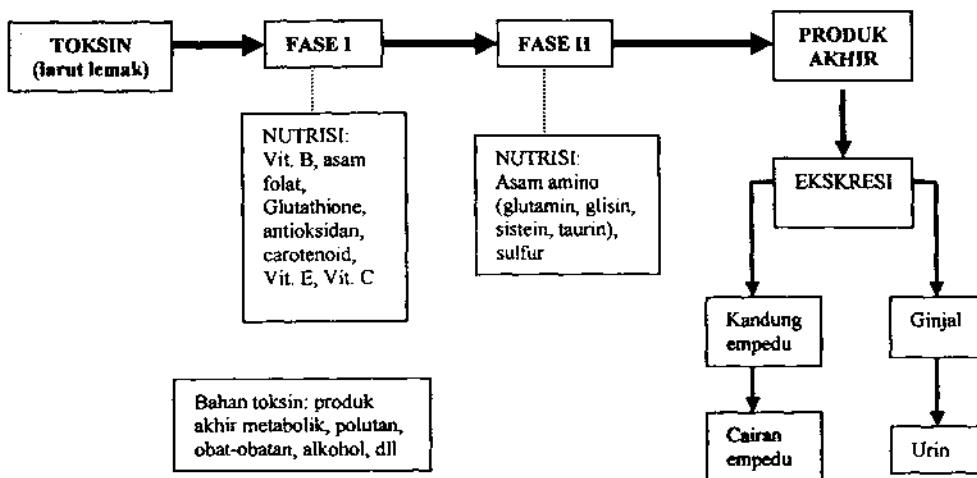
Beberapa fungsi hepar yang penting adalah (Ganong, 1999):

- Metabolisme karbohidrat, lemak dan protein
- Produksi dan ekskresi empedu
- Ekskresi bilirubin, kolesterol, hormon dan obat
- Aktifasi enzim

- Penyimpanan glikogen, vitamin dan mineral
- Sintesis protein plasma, seperti albumin dan globulin serta faktor pembekuan
- Detoksifikasi dan purifikasi darah

Salah satu fungsi penting hepar adalah sebagai proteksi tubuh terhadap racun dan benda asing yang masuk ke dalam tubuh (detoksifikasi). Hepar berperan dalam mengubah semua bahan-bahan asing atau toksin dari luar tubuh. Bahan-bahan asing atau toksin tersebut dapat berupa makanan, obat-obatan dan bahan lainnya. Kemampuan detoksifikasi ini terbatas, sehingga tidak semua bahan yang masuk didetoksifikasi dengan sempurna, tetapi ditimbun dalam darah dan dapat menimbulkan kerusakan sel-sel hepar. Dalam fungsi detoksifikasi, senyawa yang memiliki sifat meracuni sel-sel tubuh oleh hepar diubah menjadi senyawa yang tidak lagi bersifat racun, dan kemudian oleh darah dibawa ke ginjal untuk diekskresi, demikian juga sebaliknya (Murray dkk, 2003).

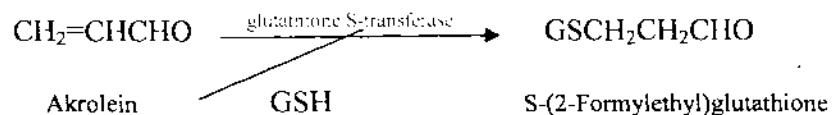
Proses detoksifikasi hepar terhadap bahan toksin terdiri dari dua fase; yaitu fase I dan fase II (gambar 2.4). Pada fase I yang melibatkan sitokrom P-450, bahan kimia yang sangat toksik diubah menjadi kurang bersifat toksik. Reaksi yang terlibat adalah reaksi oksidasi, reduksi dan hidrólisis, selama proses ini dihasilkan bahan yang bersifat radikal yang dapat merusak hepar. Selain itu produk dari fase I masih sangat lipofilik sehingga tidak bisa diekskresi. Bahan toksin yang didetoksifikasi dalam fase I antara lain: teofilin, kafein, asetaminofen, siklosporin, ketokonazol, propanolol, ibuprofen, alkohol fenitoin dan sebagainya (McKinnon & McManus, 1996).



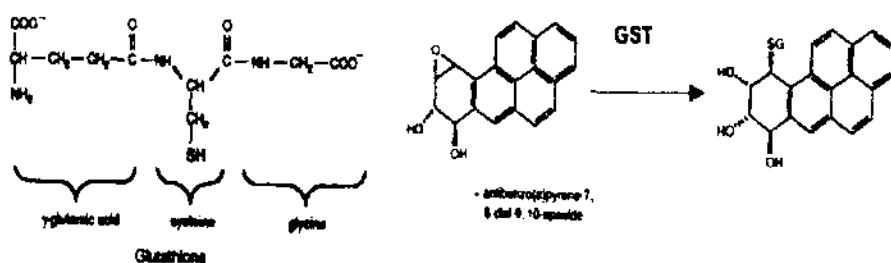
**Gambar 2.4 Proses detoksifikasi dalam hepar terdiri dari dua fase.
(Dimodifikasi: McKinnon, 1996)**

Fase II disebut juga dengan tahap konjugasi, oleh karena pada fase ini sel hepar menambahkan bahan lain ke dalam toksin seperti molekul sistein, glisin dan sulfur sehingga berkurang toksisitasnya dan yang lebih penting bahan toksin tersebut diubah menjadi larut dalam air sehingga dapat diekskresi dengan mudah bersama cairan empedu ataupun urin. Gluthatione merupakan salah satu senyawa penting dalam tahap konjugasi sehingga gluthatione disebut sebagai antioksidan kuat dan hepatoprotektor (Levy, 1986). Enzim-enzim yang berperan dalam fase II antara lain glutathione S-transferase (GST), UDP-glucuronosyltransferase dan sulfotransferase (Wu Y. dkk, 2004). Sedang bahan-bahan yang didetoksifikasi dalam tahap konjugasi antara lain: *polycyclic aromatic hydrocarbons*, akrolein, hormon steroid, golongan nitrosamin, asetaminofen, heterosiklik amin dan lain-lain (McKinnon & McManus, 1996).

Gambar 2.5 menunjukkan proses konjugasi benzo(a)pyrene pada fase II proses detoksifikasi oleh glutathione, dengan melibatkan aktifitas enzim glutathione S-transferase (Ames & Gold, 1990). Sedang konjugasi glutathione terhadap akrolein menghasilkan senyawa S-(2-Formylethyl)glutathione (WHO, 2002).



Hasil penelitian epidemiologi menunjukkan bahwa merokok merupakan masalah kesehatan karena dapat menyebabkan terjadinya berbagai macam penyakit termasuk karsinoma hepar. Selain itu telah banyak diketahui bahwa terdapat hubungan yang erat antara rokok dengan terjadinya kanker hepar (Yuan, 1996; Cerhan, 1998; Mitacek, 1999). Salah satu teori yang menjelaskan proses keganasan tersebut adalah teori radikal bebas, yaitu radikal bebas menyebabkan dehidroksilasi basa yang



Gambar 2.5 Proses konjugasi benzo(a)pyrene oleh Gluthatione.
(Sumber: Ames & Gold, 1990)

berakibat rusaknya *DNA strand* sehingga terjadi perubahan fungsi sel, sehingga menimbulkan keganasan (Yuan, 1996; Cerhan, 1998; Mitacek, 1999).

Hal tersebut diatas disebabkan karena asap rokok mengandung radikal bebas dan substansi yang dapat memicu terbentuknya radikal bebas. Radikal bebas adalah salah satu produk reaksi kimia dalam sel, berupa senyawa yang sangat reaktif oleh karena mengandung elektron yang tidak berpasangan pada kulit luarnya. Sifat radikal ini tidak stabil dan dapat bertindak sebagai reduktor (melepaskan elektron) atau oksidator (menerima elektron) (Halliwell, 1999).

Radikal bebas terutama radikal hidroksil ($\bullet\text{OH}$) dapat merusak membran sel hepar. Pada membran sel hepar terdapat beberapa struktur penyusun membran sel yang penting, yaitu fosfolipid, glikolipid dan kolesterol. Fosfolipid dan glikolipid mengandung asam lemak tak jenuh (seperti asam linoleat, asam linolenat, dan asam arakidonat) yang sangat rawan terhadap serangan-serangan radikal bebas, yang dapat menimbulkan reaksi rantai yang dikenal dengan proksidasi lipid (*lipid peroxidation*) (Suryohudoyo, 2000). Dan terbukti dari hasil penelitian bahwa paparan asap rokok menyebabkan peningkatan aktivitas radikal bebas pada sel hepar yang terdeteksi dengan peningkatan kadar MDA pada sel hepar (Yueniwati dan Ali, 1998).

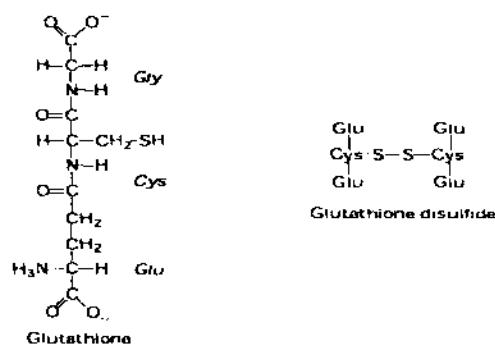
Meskipun secara patologis sebagian besar hepar mengalami gangguan jaringan yang parah, namun gejala-gejala klinis pada penderita tidak selalu dapat diamati. Hal tersebut dimungkinkan karena jaringan hepar memiliki kemampuan regenerasi yang besar, oleh karena itu kegagalan fungsi hepar kemungkinan baru terjadi setelah

sebagian besar (70%) sel-sel parenkim hepar atau hepatosit mengalami kerusakan (Murray dkk, 2003).

2.5 Gluthatione (GSH)

GSH merupakan tripeptida penting yang terdiri atas asam glutamat, sistein dan glisin (γ -glutamyl-cisteine-glycine) yang memiliki struktur seperti yang tampak pada gambar 2.6. GSH mengandung gugus sulfhidril (-SH) yang merupakan bagian yang berperan penting dalam molekul *glutathione* (Murray dkk., 2003).

GSH mampu melindungi sel terhadap serangan oksidan dan komponen xenobiotik elektrofilik yang potensial beracun (seperti karsinogen tertentu). Sistem redoks GSH mempunyai peranan yang penting dalam mempertahankan homeostasis GSH intraseluler. Di dalam sistem ini dibutuhkan GSH sebagai ko-substrat dalam proses detoksifikasi senyawa peroksidia seperti hidrogen peroksidia ataupun lipid peroksidia menjadi senyawa yang tidak berbahaya dengan melibatkan enzim



Gambar 2.6. Struktur glutathione dan glutathione disulfide
Sumber: (Oberly, 1999)

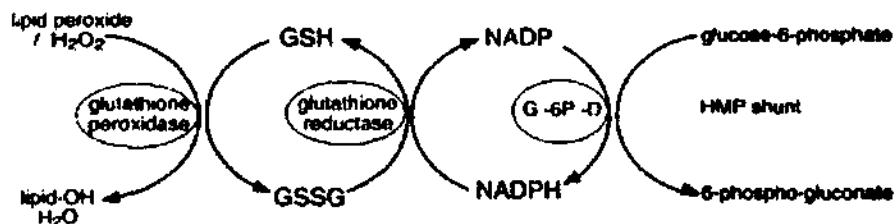
glutathion peroksidase seperti tampak pada gambar 2.7. GSH tersebut selama reaksi diubah menjadi bentuk teroksidasi GSSG dan melalui enzim glutathion reduktase akan diubah lagi menjadi bentuk GSH dengan membutuhkan NADPH yang berasal dari HMP shunt. Pada keadaan normal rasio GSH:GSSG lebih dari 90%.

Sejumlah xenobiotik elektrofilik akan terkonjugasi ke GSH nukleofilik dalam reaksi yang dapat digambarkan sebagai berikut :



R adalah xenobiotik elektrofilik. Enzim yang mengkatalisis reaksi ini disebut *glutathione S-transferase*. Jika xenobiotik yang potensial beracun ini tidak terkonjugasi, molekulnya akan bebas membentuk ikatan kovalen dengan DNA, RNA atau protein sel dan dengan demikian dapat mengakibatkan kerusakan sel yang serius. Karena itu, GSH merupakan mekanisme pertahanan yang penting terhadap senyawa toksik tertentu, seperti beberapa obat dan karsinogen (gambar 2.5 hal 23). Jika kadar GSH dalam suatu jaringan menurun, maka jaringan tersebut bisa menjadi lebih rentan terhadap cedera oleh zat kimia yang dalam keadaan normal akan terkonjugasi ke GSH (Murray dkk, 2003).

Peranan glutathione sangat penting dalam mempertahankan fungsi sel hepar. Gluthatione mitokondria sangat penting dalam mempertahankan kehidupan sel hepatosit selama keadaan hipoksia (Lluis J.M dkk, 2005). Penurunan glutathione mitokondria menyebabkan penurunan fungsi dari mitokondria oleh karena aktifitas radikal bebas (Garcia-Ruiz C. dkk, 1995).



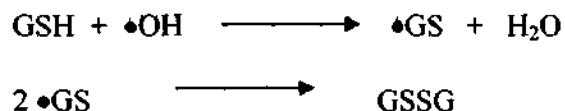
Gambar 2.7 Siklus redoks GSH
(Sumber: MacNee, 1999)

GSH memiliki beberapa fungsi penting lainnya dalam sel tubuh manusia di luar peranannya dalam metabolisme xenobiotik, yaitu (Murray dkk, 2003) :

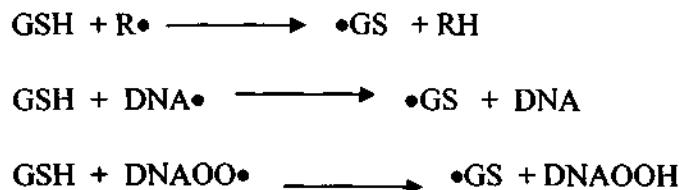
1. turut serta dalam proses dekomposisi hidrogen peroksida (H₂O₂) yang potensial beracun di dalam reaksi yang dikatalisis oleh *glutathione peroxidase*.



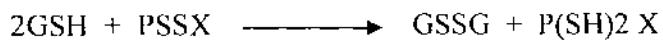
2. apabila radikal hidroksil ($\bullet\text{OH}$) masih terbentuk, maka GSH dapat meredamnya melalui reaksi sebagai berikut (Suryohudoyo, 2000) :



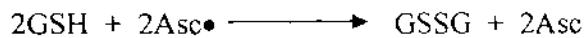
3. peredam radikal lain seperti alkil radikal, DNA radikal dan DNA peroksid radikal (Kidd PM, 1997):



4. merupakan zat pereduksi intrasel yang penting oleh karena membantu mempertahankan gugus -SH yang esensial pada sejumlah enzim dalam keadaan tereduksi:



5. mengubah kembali menjadi vitamin C dari bentuk radikalnya (Kidd PM, 1997):



GSH yang berada di paru mampu melindungi makrofag alveolar, sel epihtel pulmonal dan sel endothel pulmonal terhadap oksidan, komponen elektrofilik dan bahan xenobiotik. GSH bisa berada di intraseluler maupun ekstraseluler. Di intrasel, 90 % GSH merupakan protein non thiol dan merupakan agen pereduksi kunci sehingga berakibat pada modulasi imun serta kondisi inflamasi. Perubahan kadar GSH di ELF telah dilaporkan banyak terjadi pada berbagai kondisi inflamasi. Misalnya terjadi penurunan kadar GSH di ELF pada penyakit *idiopathic pulmonary fibrosis, acute respiratory syndrome, cystic fibrosis* dan pasien HIV (Rahman, 1999).

Penurunan kadar GSH pada perokok dan penderita PPOM terjadi karena asap rokok merupakan bahan yang bersifat xenobiotik dan juga mengandung 10^{14} radikal bebas dalam setiap kali hisap. Di dalam asap rokok juga terdapat aldehid, khususnya akrolein, asetaldehid dan formalin yang dapat menyebabkan penurunan GSH dan modifikasi gugus protein -SH dan -NH₂ (Comhair, 2002).

Apabila sintesis GSH dihambat (seperti pemberian *buthionine sulfoximine* (BSO)), mengakibatkan penurunan kadar GSH di jaringan paru dan hepar, hal ini

dapat menyebabkan terjadinya perubahan morfologi dari badan lamelar dan mitokondria dari sel-sel di jaringan tersebut. Dan pemberian glutathione mono ester dapat memperbaiki perubahan morfologi tersebut (Martensson J dkk, 1989).

2.6 Jinten Hitam (*Nigella sativa*) Sebagai Antioksidan

Dalam pengobatan pada abad 21 ini dikembangkan obat-obat baru yang berasal dari tanaman di banyak negara di dunia (Aditama, 2000). Prospek obat alami masa depan semakin cerah apalagi kecenderungan masyarakat untuk kembali ke alam dengan meninggalkan obat-obat sintetis semakin besar (Anonimus, 1997). Angka statistik menunjukkan di tahun 1994 sekitar 28,4 % masyarakat perkotaan mengobati sendiri penyakit yang diderita dan angka ini meningkat menjadi 35,4% di tahun 1995 (BPS, 1996).

Jinten hitam (*Nigella sativa*) merupakan tanaman tertua yang digunakan dalam pengobatan sepanjang sejarah manusia. Tanaman ini telah digunakan sebagai pengobatan secara alami selama kurang lebih 2000 tahun. Tanaman ini banyak tumbuh di daerah Mediterania, Yunani, Eropa, Timur tengah dan Asia termasuk Indonesia (Al Jassir, 1992; Kasule, 2000; Avicena, 2000). Di Indonesia tumbuh antara lain di Sumatra, Jawa Barat dan Jawa Tengah.

Tanaman ini mempunyai taksonomi sebagai berikut :

Divisi : Magnoliophyta

Klas : Magnoliopsidae

Subklas : Magnoliidae

Order : Ranunculales

Famili : Ranunculaceae
Genus : Nigella
Spesies : *Nigella sativa* (Luchsinger,1987)

Sesuai dengan budaya masing-masing, penggunaan jinten hitam berbeda-beda di masing-masing negara. Di Amerika digunakan untuk influenza, asma, batuk dan untuk meningkatkan sistem imun. Di India digunakan untuk meningkatkan produksi susu, anti tumor dan bakterisida. Di Indonesia digunakan untuk mengobati nyeri, keputihan, batuk, asma dan radang selaput mata. Pada pengobatan arab tradisional, jinten hitam secara sendiri atau dikombinasi dengan madu untuk mengobati asma bronkhial (Boskabody, 2002). Selain itu, di Timur Tengah dan Timur Jauh, *Nigella*



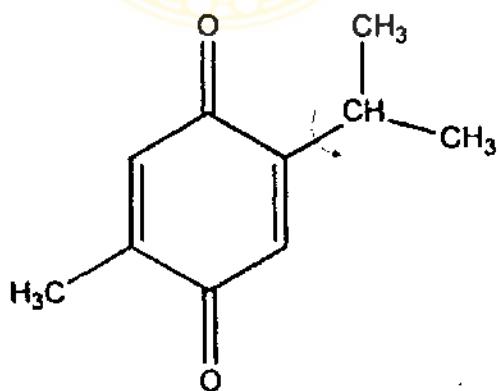
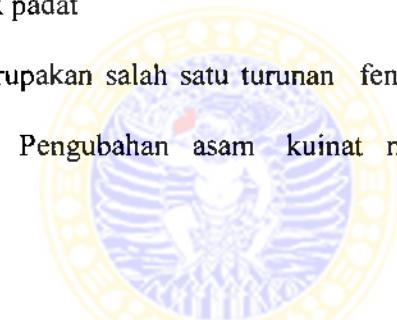
Gambar 2.8: Biji Jinten Hitam (*Nigella sativa*)
(Sumber: Al jassir, 1997)

sativa biasa digunakan secara tradisional untuk pengobatan asma bronkial, bronkitis dan rheumatik serta penyakit-penyakit yang berkaitan dengan inflamasi (Anonimus, 2000).

Bagian tanaman ini yang sering digunakan untuk pengobatan adalah bijinya (gambar 2.8). *Nigella sativa* mengandung lebih dari 100 nutrisi berharga. Sedangkan kandungan aktifnya adalah (Al Jassir, 1997; Basir, 1998):

- Thymoquinon
- Nigellon
- Minyak padat

Thymoquinon merupakan salah satu turunan fenil propan yang diperoleh dari oksidasi asam kuinat. Pengubahan asam kuinat menjadi asam 5-dehidrokuinat



Gambar 2.9. Struktur molekul thymoquinon
 (Sumber: Pagola S dkk, 2003)

dikendalikan oleh kalmodulin dan protein kinase (Robinson, 1995). Thymoquinon sendiri memiliki nama kimia *2-isopropyl-5-methyl-1,4-benzoquinon*. Pada tahun 2003 Pagola S dkk, dengan menggunakan teknik *High-Resolution X-Ray Powder Diffraction*, berhasil mendapatkan struktur molekul thymoquinon seperti yang tampak pada gambar 2.9 (Pagola S dkk, 2003). Nigellon merupakan polimer karbonil dari thymoquinon. Polimer ini lebih tidak memberikan efek toksik dan tetap memberikan efek farmakologis thymoquinon sebagai bahan utamanya (Avisiena, 2000)

Pada tahun 2000, penelitian yang dilakukan oleh Burits dan Bucar dengan menggunakan *two TLC screening methods* menguji minyak esensial dari *Nigella sativa* dan mendapatkan bahwa kandungannya berupa *thymoquinone*, *carvacrol*, *t-anethole* dan *4-terpineol* mempunyai kemampuan *radical scavenging*. Komponen-komponen yang dikandung oleh *Nigella sativa* tersebut mempunyai kemampuan *OH radical scavenging* yang efektif pada peroksidasi lipid nonenzimatis dan degradasi deoxyribose (Burits, 2000). Sementara itu, Badary dkk (2003) melakukan penelitian untuk menguji efek antioksidan *thymoquinone* dan *tert-butylhydroquinone* (TBHQ) secara *in vitro*. Kedua bahan tersebut terbukti mampu menghambat peroksidasi lipid mikrosomal. Selain itu terbukti bahwa thymoquinon lebih aktif berperan sebagai *superoxide anion scavenger* daripada TBHQ.

Shoker dan kawan-kawan melakukan penelitian tentang peranan thymoquinon murni terhadap penanganan penyakit *experimental allergic encephalomyelitis* pada tikus model. Pada penelitian tersebut diinjeksikan 1mg/kg thymoquinon melalui vena ekor. Hasilnya adalah thymoquinon tersebut dapat menghambat stres oksidatif yang terjadi pada penyakit *experimental allergic encephalomyelitis*. Hal itu ditandai

dengan meningkatnya kadar GSH di jaringan *medulla spinalis* tikus yang mendapat thymoquinon tersebut (Shoker, 2003).

Penelitian yang dilakukan Houghton dan kawan-kawan pada tahun 1995 mendapatkan hasil bahwa thymoquinon yang dikandung oleh *Nigella sativa* mempunyai kemampuan menghambat peroksidasi nonenzimatis pada liposom fosfolipid otak sapi jantan (Houghton, 1995). Percobaan yang lain dilakukan oleh El Dakhakhny terhadap fungsi protektif *Nigella sativa* pada sekresi ulkus gaster tikus yang diinduksi oleh ethanol. Tiga puluh dua tikus jantan digunakan di dalam penelitian ini. Induksi ethanol menghasilkan ulkus dengan *ulcer score* $12.62 +/- 1.35$. Hal ini mengakibatkan penurunan yang signifikan kadar glutathione dan peningkatan kadar histamin yang signifikan pula pada sekresi gaster. Sedangkan pada tikus yang diberi minyak *Nigella sativa* ternyata terdapat peningkatan signifikan kadar glutathione serta penurunan kadar histamin di dalam sekresi gasternya. (El Dakhakhny, 2000).

Daba dan Abdel Rahman pada tahun 1998 menguji sifat hepatoprotektif thymoquinon pada isolat sel hepar tikus. Sel hepar tersebut diinduksi dengan *tert-butyl hydroperoxide* (TBHP). TBHP sebanyak 2 mM digunakan untuk menginduksi *oxidative injury* pada sel hepar dan terjadi deplesi GSH intrasel, hilangnya viabilitas sel yang dibuktikan dengan tes *trypan blue* yang meningkat. Preinkubasi dengan 1 mM thymoquinone ternyata dapat mencegah hepatotoksitas yang disebabkan oleh TBHP. Hal ini terbukti dengan penurunan kadar ALT dan AST serta asupan *trypan blue* dibanding yang hanya mendapat TBHP. Selain itu, thymoquinone juga mencegah deplesi GSH akibat induksi TBHP tersebut (Daba, 1998).

Selain itu, penelitian yang dilakukan oleh Badary dan kawan-kawan pada tahun 2001 mendapatkan kemampuan efek antitumor thymoquinon pada tikus Swiss albino yang diinduksi oleh *20-methylcholanthrene* (MC) untuk membuat tikus fibrosarcoma. Pada tikus yang dinduksi dengan MC didapatkan akumulasi peroksid lipid, penurunan GSH dan juga penurunan aktivitas glutathione S-transferase (GST) dan quinone reductase (QR). Sedangkan pada tikus yang mendapat perlakuan induksi MC dan thymoquinon di dapatkan akumulasi peroksid lipid yang lebih rendah dibanding yang hanya mendapat induksi MC. Kadar GSH serta aktivitas GST juga lebih tinggi dibanding yang hanya diinduksi dengan MC (Badary, 2001).

Sedangkan percobaan lain yang dilakukan oleh Baskaran S (1999) menunjukkan paparan asap rokok selama 30 hari, 30 menit/hari terhadap tikus Albino menyebabkan peroksidasi lipid di organ paru, liver dan ginjal serta penurunan aktifitas enzim SOD; glutathione peroksidase dan glutathione-S-transferase di organ-organ tersebut.

Sementara itu penelitian yang dilakukan oleh Hartati di Fakultas Kedokteran Brawijaya pada tahun 2001, dengan menggunakan ekstrak jinten hitam dengan dosis 0.6 gr /kg BB, 1,2 gr / kgBB dan 2,4 gr /kg BB, ternyata dapat memperbaiki kerusakan sel-sel epithel bronkus tikus wistar yang diakibatkan oleh diet atherogenik selama 10 minggu. Hal ini ditandai dengan kembali normalnya jumlah inti sel, tumbuhnya kembali silia serta menurunnya sel radang di lapisan mukosa bronkus dibanding yang hanya mendapat diet atherogenik (Hartati, 2001).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3. 1 Kerangka Konsep

Asap rokok mengandung banyak radikal bebas. Radikal bebas/oksidan dalam asap rokok terbagi dalam dua fase, yaitu dalam fase gas dan fase tar. Pada fase gas, asap rokok mengandung 10^{14} molekul radikal bebas dalam tiap kali hisap. Sebagian besar radikal bebas dalam fase ini adalah radikal bebas yang berumur pendek yang segera dapat dinetralkan oleh antioksidan yang berada di ELF. Sedangkan dalam fase tar, sebagian besar merupakan radikal bebas organik seperti radikal semiquinone yang sulit dinetralkan. Radikal semiquinone dapat bereaksi dengan oksigen membentuk $O_2^{\cdot+}$ (superoksid) yang dapat berlangsung dalam jangka waktu lebih lama. Hydroquinone/quinone dalam tar dapat menembus paru, berdifusi pada membran sel dan ikut dalam reaksi redoks yang terjadi di ekstraseluler dan intraseluler sehingga akan membentuk senyawa semiquinone, H_2O_2 serta $O_2^{\cdot+}$.

Asap rokok yang dipaparkan atau dihirup masuk ke dalam tubuh dapat menyebabkan terjadinya peningkatan ROS di dalam tubuh. Apabila peningkatan oksidan/ radikal bebas ini tidak diimbangi dengan peningkatan antioksidan baik itu berupa enzim maupun non enzim maka akan terjadi stres oksidatif. Stres oksidatif merupakan kondisi gangguan keseimbangan antara oksidan dan antioksidan (peningkatan oksidan tidak mampu diimbangi oleh antioksidan) yang berpotensi

menimbulkan kerusakan. Keadaan stres oksidatif dapat menyebabkan berbagai macam kerusakan sel di dalam tubuh.

Di samping itu peningkatan ROS dalam tubuh akan menyebabkan sistem antioksidan tubuh berusaha meredamnya baik yang berupa enzim (seperti SOD, katalase, glutathione, glutathione peroksidase) maupun yang nonenzimatis (seperti vitamin C dan E). ROS yang ada terlalu besar jumlahnya dapat menyebabkan penurunan sistem antioksidan tubuh, seperti penurunan GSH jaringan.

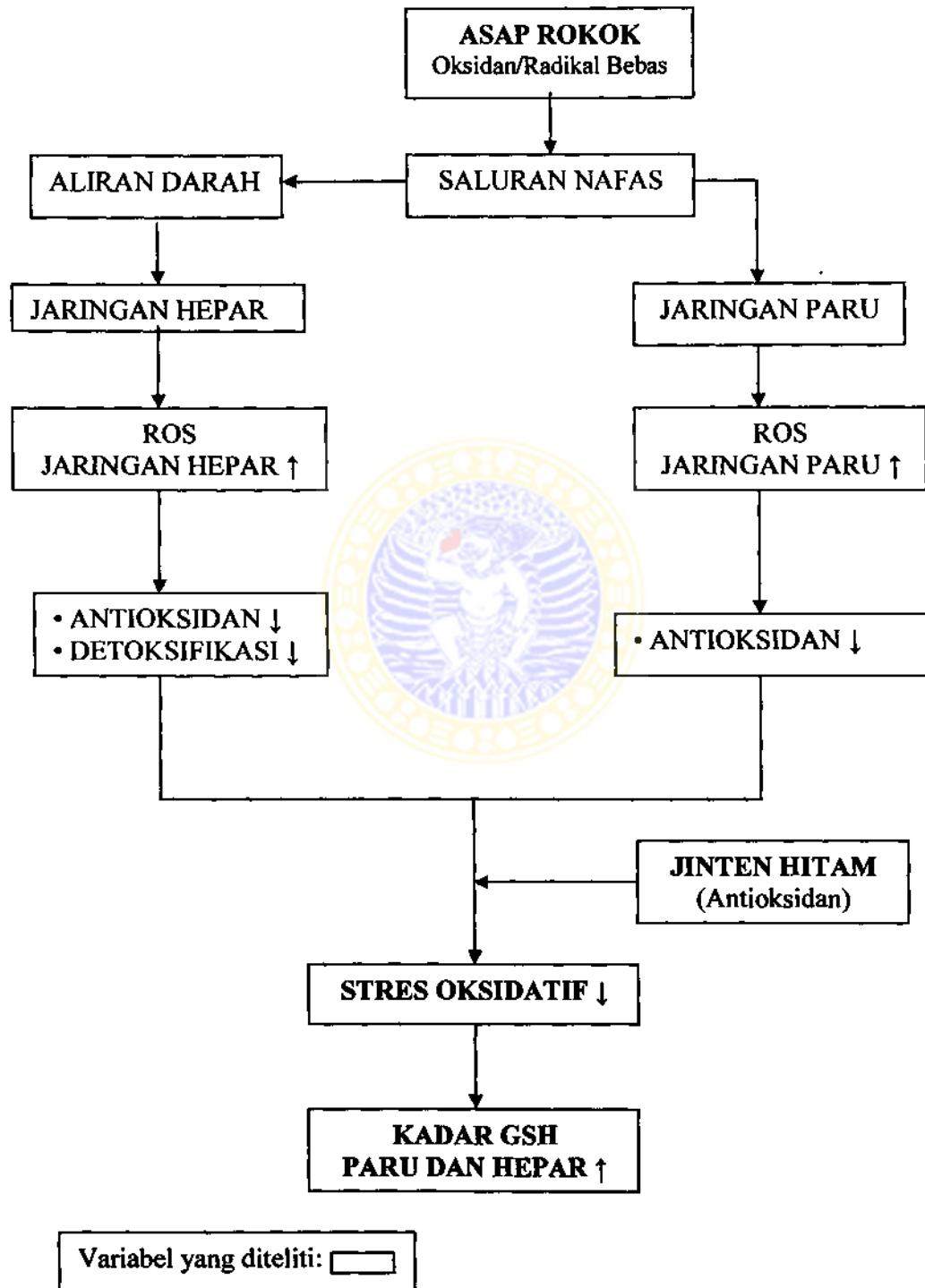
Jinten hitam merupakan bahan alam yang telah lama digunakan dalam pengobatan tradisional. Badary dkk (2003) melakukan penelitian untuk menguji efek antioksidan thymoquinone dan *tert-butylhydroquinone* (TBHQ) secara *in vitro*. Kedua bahan tersebut terbukti mampu menghambat peroksidasi lipid mikrosomal. Selain itu terbukti bahwa tyhmoquinon lebih aktif berperan sebagai *superoxide anion scavenger* daripada TBHQ.

Daba dan Abdel Rahman pada tahun 1998 menguji sifat hepatoprotektif thymoquinone pada isolat sel hepar tikus. Sel hepar tersebut diinduksi dengan *tert-butyl hydroperoxide* (TBHP). TBHP sebanyak 2 mM menginduksi *oxidative injury* pada sel hepar dan terjadi penurunan GSH intrasel serta hilangnya viabilitas sel yang dibuktikan dengan tes *trypan blue* yang meningkat. Preinkubasi dengan 1 mM thymoquinon ternyata dapat mencegah hepatotoksitas yang disebabkan oleh TBHP. Hal ini terbukti dengan penurunan kadar ALT dan AST serta asupan *trypan blue* dibanding yang hanya mendapat TBHP. Selain itu, thymoquinon juga mencegah deplesi GSH akibat induksi TBHP tersebut (Daba, 1998).

Penelitian-penelitian tersebut menunjukkan bahwa jinten hitam memiliki potensi sebagai antioksidan sehingga bisa dimanfaatkan untuk mencegah terjadinya stres oksidatif dalam tubuh dengan meningkatkan kadar GSH akibat paparan asap rokok.



3.1 KERANGKA KONSEP



3.2 Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian ini adalah :

1. Pemberian ekstrak jinten hitam dapat meningkatkan kadar GSH jaringan paru tikus wistar yang dipapar asap rokok.
2. Pemberian ekstrak jinten hitam dapat meningkatkan kadar GSH jaringan hepar tikus wistar yang dipapar asap rokok.

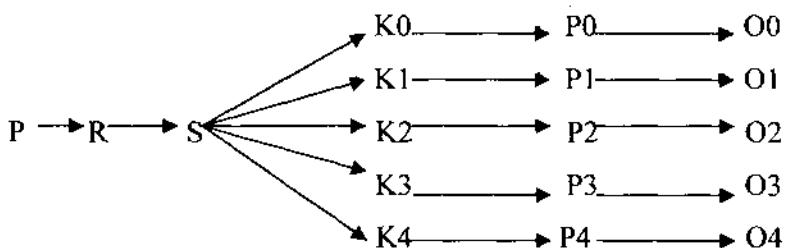


BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan secara eksperimental di dalam laboratorium. Penelitian ini dirancang untuk memenuhi tujuan penelitian yang hendak mengungkapkan pengaruh pemberian ekstrak jinten hitam terhadap kadar GSH jaringan paru dan hepar. Terdapat kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dari sampel yang dipilih secara acak dan setiap kelompok dilakukan pengulangan. Pengamatan dilakukan setelah diberikan perlakuan pada semua kelompok, sehingga rancangan penelitian yang digunakan adalah *post test only control group design* (Tjokronegoro & Sudarsono, 1985).



Keterangan:

- P : Populasi
- S : Sampel
- R : Randomisasi
- K0 : kelompok kontrol
- K1,K2,K3,K4 : kelompok perlakuan 1,2,3,4
- P0 : diberi sonde aquadest
- P1 : dipapar asap rokok selama 1 bulan + sonde aquadest

P2,P3,P4 :dipapar asap rokok selama 1 bulan dan ekstrak jinten hitam dengan dosis masing- masing: 0,6 gr/KgBB, 1,2 gr/KgBB dan 2,4 gr/KgBB

O,O1,O2,O3,O4: pengambilan data post test

4.2 Populasi, Sampel, Teknik Pengambilan Sampel dan Besar Sampel

4.2.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) dewasa jantan yang telah berumur 2-3 bulan dengan berat badan 150 – 250 gram dengan kondisi sehat yang ditandai dengan gerakannya yang aktif dari Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Surabaya.

4.2.2 Sampel

Sampel dalam penelitian ini dibagi menjadi 1 kelompok kontrol dan empat (4) kelompok perlakuan yang masing-masing terdiri dari 6 ekor. Dari kelompok perlakuan, satu kelompok hanya dipapar asap rokok selama 1 bulan, sedangkan tiga (3) kelompok lainnya dipapar rokok dan diberi ekstrak jinten hitam personde dalam berbagai dosis. Dosis ekstrak nigella sativa dimulai dari dosis kecil hingga besar. Besarnya dosis diukur berdasar berat badan tikus dan berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Hartati (2001).

Pembagian kelompok tikus tersebut diatas adalah sebagai berikut :

- **Kelompok Kontrol negatif** : Tanpa dipapar asap rokok dan tanpa diberi ekstrak jinten hitam (sonde aquadest)
- **Kelompok kontrol positif** : dipapar asap rokok selama 1 bulan tanpa diberi ekstrak jinten hitam (sonde aquadest)

- **Kelompok Perlakuan** : Dipapar asap rokok selama 1 bulan
 - **Kel A** : Dipapar asap rokok dan diberi eks. Jinten hitam dosis 0,6 gr/kgBB/hari.
 - **Kel B** : Dipapar asap rokok dan diberi eks. jinten hitam dosis 1,2 gr/kgBB/hari
 - **Kel C** : Dipapar asap rokok dan diberi eks. jinten hitam dosis 2,4 gr/kgBB/hari

4.2.3 Teknik Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dan pembagian kelompok dilakukan dengan cara *simple random sampling* (Tjokronegoro & Sudarsono, 1985).

4.2.4 Besar Sampel

Adapun besar sampel ditentukan dengan rumus Higgin & Klinbaum (1985) sebagai berikut:

$$n = \frac{1}{1-f} \times \frac{2(Z_\alpha + Z_\beta)^2 \cdot S_c^2}{(X_c - X_t)^2}$$

keterangan:

n = Besar sampel

X_t = Nipura kelompok eksperimen

X_c = Nipura kelompok kontrol

S_c = Simpang baku kelompok kontrol

f = proporsi kegagalan

$$Z\alpha = 1,96 \ (\alpha = 0,05)$$

$$Z\beta = 1,28 \ (\beta = 0,10)$$

Berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Edyson, 2002 diperoleh data sebagai berikut :

$$X_t \text{ (Nipura kelompok eksperimen)} = 0,63240$$

$$X_c \text{ (Nipura kelompok kontrol)} = 2,14400$$

$$S_c \text{ (Simpangan baku kelompok kontrol)} = 0,30221$$

Besar sampel (n) diperoleh bila $f = 0$ adalah 0,68, bila $f = 0,5$ maka $n = 1,37$, sehingga dibulatkan menjadi 1 ekor tikus setiap kelompok. Tetapi dari penelitian sejenis yang dilakukan oleh Prasiska (2004) menggunakan sampel sebanyak 6 ekor tikus telah menunjukkan hasil yang bermakna, sehingga besar sampel yang digunakan dalam setiap kelompok dalam penelitian ini adalah 6 dan besar sampel secara keseluruhan adalah 30.

4.3 Variabel penelitian

4.3.1 Variabel bebas

- Asap rokok kretek
- Ekstrak jinten hitam

4.3.2 Variabel Tergantung

- Kadar GSH jaringan paru
- Kadar GSH jaringan hepar

4.4 Definisi Operasional

- **Asap rokok**

Adalah asap rokok dari jenis kretek tertentu yang dipaparkan menggunakan peralatan yang disebut '*smoking pump*' buatan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dengan dosis dua kali sehari satu batang pagi dan satu batang sore hari selama 1 bulan (Baskaran S (1999), Christyaningsih (2002) dan Yueniwati(2001).

- **Ekstrak jinten hitam**

Adalah ekstrak jinten hitam yang diperoleh melalui proses ekstraksi dengan ethanol 96 % sebanyak 3 kali di Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya Malang.

- **Kadar GSH jaringan**

Adalah kadar GSH jaringan paru dan hepar tikus wistar yang diukur dengan menggunakan metode Ellman (Gupta, 2004).

4.5 Tempat dan Waktu Penelitian

4.5.1 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.5.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 10 bulan, mulai bulan Oktober 2004 sampai Juli 2005. Perincian waktu tersebut adalah :

- Mulai bulan Oktober 2004 penelusuran kepustakaan
- 4 bulan penyusunan proposal penelitian
- 1 bulan perlakuan
- 3 minggu pengumpulan data
- 3 minggu analisis data dan pembuatan laporan

4.6 Bahan dan Alat Penelitian

4.6.1 Bahan

4.6.1.1 Hewan Uji

Menggunakan *Rattus norvegicus* strain *Wistar* jenis kelamin jantan dewasa yang berumur 2 – 3 bulan, berat badan 150 – 250 gram dengan kondisi sehat yang ditandai dengan gerakannya yang aktif dari Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Surabaya. Tikus dipelihara di dalam kandang berukuran 20 x 30 x 40 cm, dimana setiap kandang berisi 6 ekor tikus. Tikus diberi makan standar.

4.6.1.2 Bahan untuk Perlakuan

4.6.1.2.1 Rokok

Asap rokok yang dipaparkan berasal dari rokok kretek tanpa filter merek tertentu.

4.6.1.2.2. Ekstrak Jinten Hitam

4.6.1.2.2.a Bahan untuk Ekstrak Jinten Hitam

1. Biji *Nigella sativa* (jinten hitam) sebanyak 1 kg yang diperoleh dari Dinas Kesehatan Balai Materia Medica Pemerintah Propinsi Jawa Timur di Kota Batu. Penghitungan konversi dosis jinten hitam hasil ekstraksi lihat di lampiran 1.
2. Etanol 96 %
3. Kertas saring

4.6.1.2.2.b Ekstraksi Jinten Hitam

- Proses Ekstraksi

1. *Nigella sativa* dihaluskan dengan blender hingga menyerupai bubuk .
2. Ditimbang dengan timbangan analitik.
3. Dimasukkan dengan corong pisah yang telah diberi kertas saring pada ujungnya
4. Ditambah ethanol
5. Diinapkan selama semalam (\pm 24 jam)
6. Cairan dipisahkan dari bubuknya kemudian cairan dievaporasi
7. Bubuk ditambah ethanol lagi sampai ekstraksi jernih

- Proses Evaporasi

1. Pasang evaporator pada tiang permanen agar dapat tergantung dengan kemiringan $30 - 40^\circ$ terhadap meja percobaan.
2. Pindahkan hasil ekstraksi, termasuk batu didihnya, dari labu destilasi ke labu pemisah ekstraksi.

3. Letakkan satu set alat evaporasi sehingga sebagian labu pemisah ekstraksi terendam aquadest pada *water bath*.
4. Hubungkan *water bath* dengan sumber listrik dan naikkan suhunya menjadi 70° C (sesuai titik didih etanol).
5. Biarkan sirkulasi berjalan sehingga hasil evaporasi tersisa di dalam labu pemisah ekstraksi.
6. Hasil akhir inilah yang akan digunakan dalam penelitian.

4.6. 1. 3 Bahan untuk Pemeriksaan

Bahan Untuk Pemeriksaan GSH

- Sulfosalicylic acid 4 %
- Sodium buffer fosfat (0,1 mM, pH 7,4)
- DTNB (1,2-dithiobisnitrobenzoic acid) 0,01 M
- Jaringan paru dan hepar masing-masing 400 gram

4.6.2 Alat

a. Alat untuk Pemberian Asap Rokok

“*Smoking pump*” buatan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Alat ini berupa kotak *fiberglass* yang terbagi menjadi tiga ruangan, masing-masing berukuran 26 x 12 x12 cm. Di dalam setiap ruang terdapat pipa untuk mengalirkan asap rokok. Ketiga pipa ini nantinya menyatu keluar

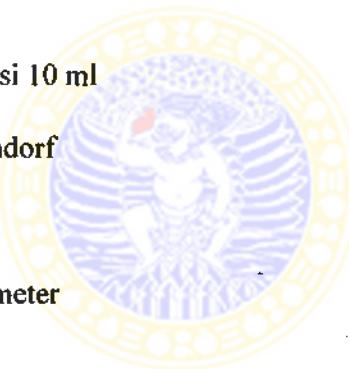
dengan pipa yang dipasangi rokok. Bagian lainnya yaitu pompa berfungsi menghisap asap rokok yang bekerjanya dibantu adaptor.

b. Alat untuk Pemberian Ekstrak Jinten Hitam

Alat suntik (*syringe*) yang ujungnya dipasang suatu sonde yang dapat dimasukkan ke dalam mulut tikus wistar hingga mencapai oesophagus.

c. Alat untuk Pemeriksaan GSH

- Timbangan
- Mortal
- Tabung reaksi 10 ml
- Tabung ependorf
- Sentrifuge
- Spektrofotometer

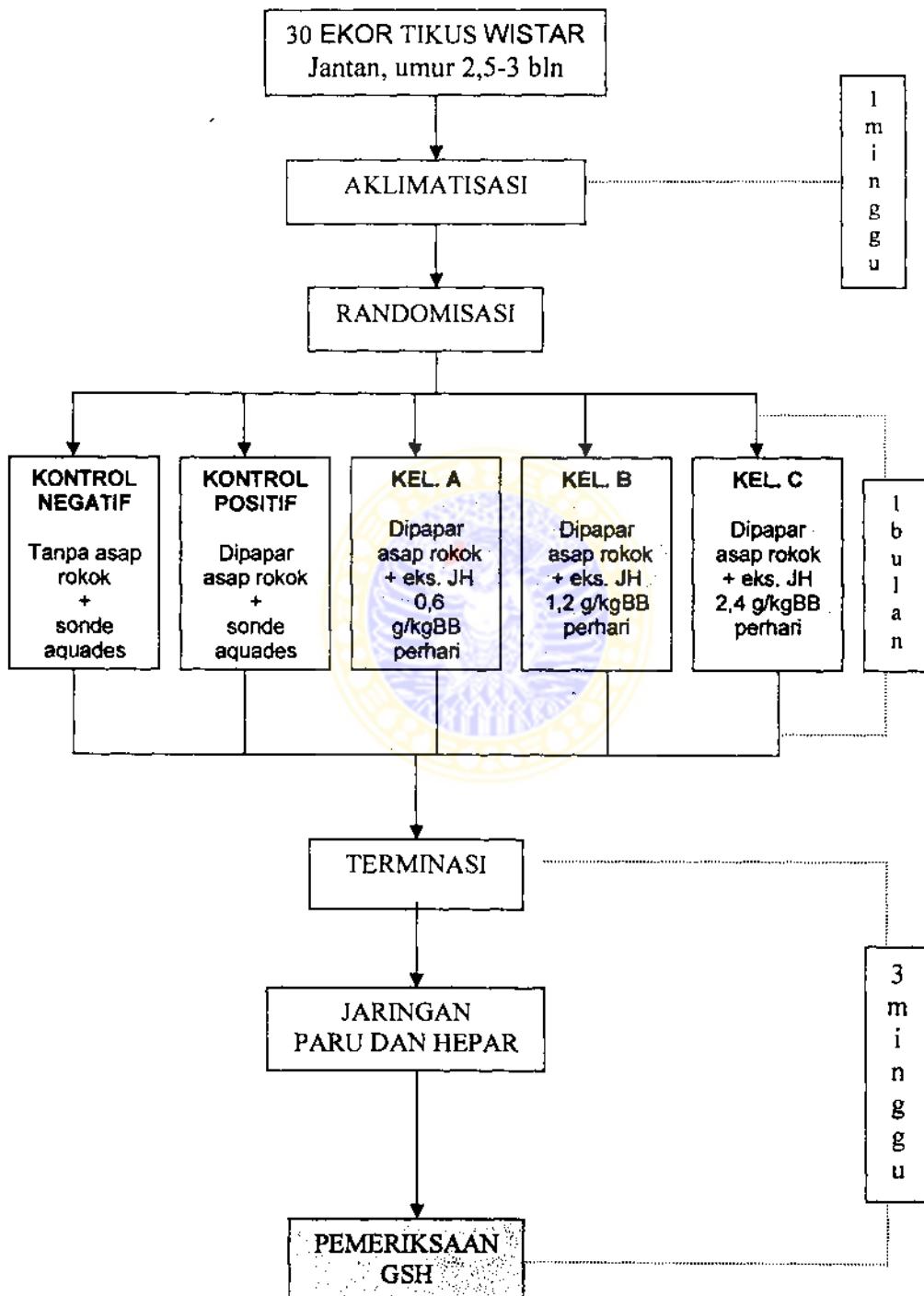


4.7 Cara Kerja

4.7.1 Aklimatisasi

Aklimatisasi hewan coba selama 7 hari terhadap air, makanan serta hawa di dalam kondisi laboratorium.

4.7.2 Alur Penelitian



4.7.3 Pemaparan dengan Asap Rokok

Setiap pemaparan menggunakan asap rokok jenis kretek dengan bantuan alat "smoking pump". Dosis pemaparan setiap tiga ekor tikus adalah dua batang rokok perhari selama 1 bulan. Satu batang rokok pagi hari dan satu batang rokok sore hari.

Cara Pemaparan :

- Tikus ditimbang berat badannya sebelum dipapar
- Tempat pemaparan dibersihkan dari kotoran dan asap sisa
- Nikotin yang melekat pada klep alat "smoking pump" dibersihkan lebih dahulu
- Power dan *self voltage* diperiksa
- Rokok kretek dipasang pada pipa sampai batas merah
- Tiga ekor tikus dimasukkan ke dalam kotak dan segera ditutup.
- Setiap kali pemaparan asap rokok dilakukan dengan cara menjalankan pompa dan dibiarkan selama 7,5 menit kemudian *switch* dimatikan, tutup dibuka dan selanjutnya tikus segera dipindahkan ke kandang semula.
- Setiap pemaparan dengan asap rokok berikutnya, kotak selalu dibersihkan lebih dahulu dari sisa asap rokok sebelumnya.
- Pompa dijalankan tanpa rokok untuk mengeluarkan sisa asap
- Tahap-tahap diatas diulangi untuk kelompok tikus berikutnya

4.7.4 Pemeriksaan GSH jaringan paru dan hepar

Prinsip pemeriksaan:

Bila DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)) bereaksi dengan GSH maka akan membentuk 2,5 DTNB (2-nitro-5-thiobenzoic acid) dan GSSG yang berwarna kuning. Kemudian dilihat dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang tertentu (nm).

Cara kerja:

- Membuat kurva baku GSH
- Timbang jaringan paru dan hepar yang telah diperfusi masing-masing sebanyak 400 mg.
- Masing-masing diendapkan dengan 1 ml sulfosalicylic acid (4 %)
- Didiamkan selama 1 jam pada suhu 4°C
- Digerus dengan mortar diatas termos es
- Dimasukkan ke dalam tabung ependorf bersama pelarutnya
- Sentrifuge 6000 G selama 15 menit pada suhu 4 °C
- Supernatan diambil
- Supernatan sebanyak 0,25 ml ditambahkan dengan 2,7 ml sodium fosfat buffer (0,1 mM, pH 7,4) dan 0,2 ml DTNB
- Timbul warna kuning
- Baca di spcktrofotometer pada gelombang 412 nm

4.8 Analisis Data

Analisis data dalam penelitian ini menggunakan manova dan *Tukey HSD Test*.

BAB 5

HASIL PENELITIAN

5.1 Hasil Uji Statistik Deskriptif

Hasil uji statistik deskriptif kadar GSH jaringan paru dan hepar setelah diberi perlakuan asap rokok selama 1 bulan dan jinten hitam dengan berbagai dosis dapat dilihat pada tabel 5.1.

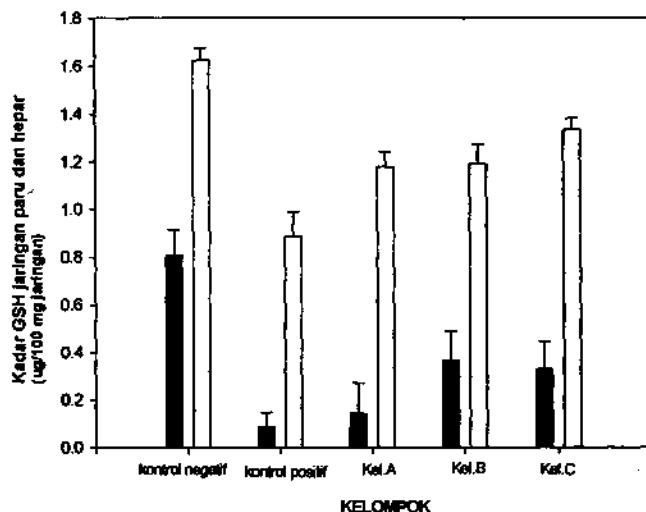
Tabel 5.1: Hasil pengukuran kadar GSH jaringan paru dan hepar tikus

Kelompok	Rerata ± SD GSH PARU (umol/100 mg jar.)	Rerata ± SD GSH HEPAR (umol/100 mg jar.)
Kontrol negatif (n=5)	0.80778 ± 0.10218	1.62237 ± 0.050554
Kontrol positif (n=6)	0.08980 ± 0.057562	0.88356 ± 0.10300
Kel. A (n=6)	0.14575 ± 0.12619	1.17732 ± 0.06313
Kel. B (n=6)	0.36760 ± 0.11998	1.18912 ± 0.083093
Kel. C (n=5)	0.33261 ± 0.11284	1.33379 ± 0.046128

Keterangan:

- | | |
|--------------------|--|
| 1. Kontrol negatif | : Tanpa paparan asap rokok dan tidak diberi ekstrak jinten hitam |
| 2. Kontrol positif | : Dipapar asap rokok selama 1 bulan, tanpa diberi ekstrak jinten hitam |
| 3. Kelompok A | : Dipapar asap rokok selama 1 bulan dan diberi ekstrak jinten hitam 0.6 gr/KgBB /hari. |
| 4. Kelompok B | : Dipapar asap rokok selama 1 bulan dan diberi ekstrak jinten hitam 1.2 gr/ KgBB/hari. |
| 5. Kelompok C | : Dipapar asap rokok selama 1 bulan dan diberi ekstrak jinten hitam 2.4 gr/KBB/hari |

Tabel 5.1 dan grafik 5.1 menunjukkan hasil pengukuran kadar GSH jaringan paru pada kelompok kontrol positif (0.08980 ± 0.057562 umol/100 mg jar.) adalah lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (0.80778 ± 0.10218 umol/100 mg jar.). Kemudian kadar GSH paru pada kelompok A yang mendapat jinten dosis

**Gambar 5.1** Grafik pemeriksaan GSH paru dan hepar setelah perlakuan

GSH kontrol positif lebih rendah bermakna dari kontrol negatif baik di paru maupun hepar. Pada kel.A, GSH hepar lebih tinggi bermakna dari kontrol positif, di paru tidak bermakna. Kel.B dan C lebih tinggi bermakna dari kontrol positif baik paru maupun hepar. Data yang ditampilkan adalah nilai rata-rata±SD, bermakna bila $p<0,05$ (jumlah n total:28). Hitam:paru, Abu-abu:hepar.

0,6 gram/KgBB/hari adalah lebih tinggi (0.14575 ± 0.12619 umol/100 mg jar) dibandingkan kontrol positif, begitu pula pada kelompok B dan C yang mendapat jinten hitam dengan dosis 1,2 gram/KgBB/hari dan 2,4 gram/KgBB/hari juga lebih tinggi berturut-turut (0.36760 ± 0.11998 umol/100 mg jar) dan (0.33261 ± 0.11284 umol/100 mg jar) dibandingkan dengan kelompok kontrol positif.

Tabel 5.1 dan grafik 5.1 menunjukkan pula hasil pengukuran kadar GSH jaringan hepar pada kelompok kontrol positif (0.88356 ± 0.10300 umol/100 mg jar) adalah lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (1.62237 ± 0.050554 umol/100 mg jar). Kemudian pada kelompok A, B, dan C yang mendapat jinten hitam dengan dosis berturut-turut 0,6 gram/KgBB/hari, 1,2 gram/KgBB/hari dan 2,4 gram/KgBB/hari adalah lebih tinggi berturut-turut (1.17732 ± 0.06313 umol/100 mg

jar), (1.18912 ± 0.083093 umol/100 mg jar) dan (1.33379 ± 0.046128 umol/100 mg jar) dibandingkan dengan kelompok kontrol positif.

5.2 Hasil Uji Manova dan *Tukey HSD*

Uji manova dilakukan untuk mengetahui efek perlakuan terhadap kadar GSH paru dan GSH hepar secara bersama-sama. Hasilnya, baik GSH paru maupun GSH hepar menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p=0.000$). Uji *one way anova* dilakukan untuk mengetahui manakah yang berbeda bermakna antara variabel GSH paru dan GSH hepar setelah uji manova. Untuk variabel tergantung GSH jaringan paru didapatkan hasil bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok ($p=0.000$). Analisis kemudian dilanjutkan dengan menggunakan *Tukey HSD test* untuk mengetahui kelompok mana saja yang berbeda secara bermakna. Hasilnya adalah kadar GSH paru dari kelompok kontrol positif lebih rendah secara bermakna dibandingkan dengan kadar GSH paru kelompok kontrol negatif ($p=0.000$).

Pada kelompok yang diberi ekstrak jinteh hitam, kelompok A dengan dosis 0.6 gram/KgBB/hari selama 1 bulan, kadar GSH paru lebih tinggi tetapi tidak bermakna ($p=0.890$) dibandingkan dengan kelompok kontrol positif yang hanya mendapat paparan asap rokok. Pada kelompok B yang diberi ekstrak jinten hitam dengan dengan dosis 1.2 gram/KgBB/hari selama 1 bulan lebih tinggi secara bermakna ($p=0.012$) dibandingkan dengan kelompok kontrol positif, demikian halnya dengan kelompok C yang mendapat dosis ekstrak jinten hitam 2,4 gram/KgBB/hari lebih tinggi secara bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol positif ($p=0.009$).

Kemudian hasil analisis *one way anova* untuk variabel tergantung kadar GSH jaringan hepar didapatkan hasil bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok setelah perlakuan ($p=0.000$). Analisis dengan menggunakan *Tukey HSD* untuk mengetahui kelompok mana saja yang berbeda dari variabel tergantung GSH hepar menunjukkan bahwa kelompok kontrol positif lebih rendah secara bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif ($p=0.000$), sedang kelompok A yang mendapat ekstrak jinten hitam dengan dosis 0.6 gram/KgBB/hari selama 1 bulan lebih tinggi secara bermakna ($p=0.000$) dibandingkan dengan kelompok kontrol positif yang hanya diberi asap rokok tanpa jinten hitam. Demikian pula kelompok B dan C yang diberi ekstrak jinten hitam masing-masing dengan dosis 1.2 gram/KgBB/hari dan 2.4 gram/KgBB/hari selama 1 bulan, menunjukkan hasil lebih tinggi secara bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol positif ($p=0.000$ dan $p=0.000$) (hasil analisis terlampir).

Dari analisis tersebut diatas nampak bahwa pemberian asap rokok selama 1 bulan dapat menurunkan kadar GSH baik di paru maupun di hepar dan pemberian ekstrak jinten hitam dapat meningkatkan kadar GSH paru dan hepar. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak jinten hitam dapat mempengaruhi kadar GSH paru dan GSH hepar tikus setelah dipapar dengan asap rokok selama 1 bulan, dimana pada kelompok yang mendapat ekstrak jinten hitam kadar GSH nya meningkat dibandingkan kelompok yang hanya mendapat asap rokok saja tanpa jinten hitam. Semakin besar dosis jinten hitam yang diberikan semakin besar pula pengaruhnya, hal ini ditandai dengan hasil pemeriksaan kadar GSH baik dari jaringan paru maupun hepar yang makin besar.

Catatan:

Hipotesis yang diajukan untuk rata-rata hasil pemeriksaan kadar GSH adalah:

H0: tidak ada perbedaan rata-rata hasil pemeriksaan kadar GSH

H1: ada perbedaan rata-rata hasil pemeriksaan kadar GSH

Dasar pengambilan keputusannya adalah:

Jika probabilitas $> 0,05$ maka H0 diterima atau tidak ada perbedaan rata-rata hasil pemeriksaan kadar GSH

Jika probabilitas $< 0,05$ maka H0 ditolak atau terdapat perbedaan rata-rata hasil pemeriksaan kadar GSH.



BAB 6 PEMBAHASAN

Tujuan utama penelitian ini adalah membuktikan bahwa pemberian ekstrak jinten hitam dapat meningkatkan kadar GSH di jaringan paru dan hepar tikus wistar yang dipapar asap rokok. GSH merupakan senyawa tripeptida yang sangat penting perannya dalam pertahanan tubuh, selain berfungsi sebagai antioksidan, GSH juga berperan dalam proses detoksifikasi di dalam hepar (Levy, 1986). Penurunan kadar GSH merupakan salah satu petanda dari stres oksidatif. Stres oksidatif merupakan kondisi terjadinya gangguan keseimbangan antara oksidan dan antioksidan dimana oksidan meningkat melebihi kemampuan antioksidannya (Sies,1991).

Asap rokok digunakan karena asap rokok merupakan salah satu sumber oksidan dan radikal bebas dalam jumlah besar dan sudah sering dipakai dalam penelitian-penelitian terdahulu tentang radikal bebas. Asap rokok mengandung 10^{14} molekul radikal bebas dalam setiap hisapnya. Asap rokok juga mengandung bahan-bahan seperti hydroquinon/quinon, akrolein, asetaldehid dan formalin yang dapat memicu terbentuknya radikal bebas dalam tubuh seperti radikal anion superoksid dan hidrogen peroksid (Haliwell, 1999), sehingga pemaparan asap rokok akan menyebabkan peningkatan radikal bebas dalam tubuh yang selanjutnya dapat menyebabkan kondisi stres oksidatif.

Pada penelitian ini digunakan ekstrak jinten hitam untuk mencegah terjadinya stres oksidatif akibat paparan asap rokok karena jinten hitam merupakan salah satu

bahan tradisional yang sudah lama dipakai sebagai obat terhadap berbagai macam penyakit, dan dari beberapa penelitian sebelumnya telah diketahui bahwa jinten hitam mengandung bahan-bahan aktif yang bersifat sebagai antioksidan. Bahan-bahan aktif tersebut antara lain: *thymoquinone*, *carvacrol*, *t-anethol* dan *4-terpineol* (Burist dan Bucar, 2000).

Sedang hewan coba yang dipakai adalah tikus wistar (*Rattus Norvegicus*) jantan, dewasa yang berumur antara 2,5 – 3 bulan dengan berat badan antara 150 – 200 gram yang diperoleh dari Laboratorium Biokimia Universitas Airlangga. Kriteria populasi tersebut dimaksudkan untuk mendapatkan sampel sehomogen mungkin sehingga dapat meminimalisir terjadinya bias terhadap hasil penelitian.

Analisis statistika yang digunakan dalam penelitian ini adalah manova dan *Tukey HSD test*. Hal ini sesuai dengan tujuan utama penelitian kami yaitu membuktikan bahwa pemberian ekstrak jinten hitam dapat meningkatkan kadar GSH jaringan paru dan hepar tikus wistar yang dipapar dengan asap rokok selama 1 bulan.

Pada kelompok kontrol positif kadar GSH jaringan paru dan hepar lebih rendah secara bermakna dibanding dengan kelompok kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa paparan asap rokok selama 1 bulan dapat menyebabkan penurunan kadar GSH di jaringan paru dan hepar tikus. Ini bisa terjadi karena asap rokok banyak mengandung bahan-bahan yang bersifat oksidan (gambar 2.1 hal 9). Diantaranya mengandung 10^{14} molekul radikal bebas dalam setiap hisapnya meskipun sifatnya tidak stabil dan mudah dinetralisir oleh sistem pertahanan tubuh yang ada di alveoli paru (Church, 1985). Akan tetapi asap rokok juga mengandung semiquinon/hidroquinon yang sifatnya relatif stabil dan dapat mencapai paru yang

selanjutnya dapat memicu terbentuknya radikal bebas dengan terlibat dalam reaksi redoks di dalam sel, menghasilkan bahan radikal yaitu radikal anion superoksid dan hidrogen peroksida, selanjutnya radikal ini dapat membangkitkan radikal lain seperti radikal hidroksil dan peroksinitrit yang dapat merusak komponen-komponen sel (MacNee, 2000, Repine, 1997, Halliwell, 1999).

Oleh karena asap rokok juga merupakan bahan xenobiotik, keberadaannya dapat mengaktifasi makrofag jaringan paru dan sel-sel radang lain menghasilkan anion superoksid melalui peristiwa yang disebut dengan *respiratory burst* (Halliwell, 1999). Selain itu kandungan bahan toksik dalam asap rokok seperti nikotin dapat menyebabkan aktifasi dari sitokrom P-450 (CYP2A6 di hepar dan CYP1A1 di paru) sehingga terjadi pembangkitan radikal bebas terutama radikal anion superoksid (Kalpana & Mennon, 2004). Akibatnya, terjadi penumpukan radikal bebas (ROS) terutama radikal anion superoksid di dalam paru dan hepar dengan jumlah yang sangat besar. Peningkatan radikal anion superoksid akan diikuti oleh peningkatan oksidan lain seperti hidrogen peroksida dan radikal hidroksil.

Akibatnya, antioksidan tubuh termasuk GSH, akan berusaha meredam radikal bebas tersebut. Karena dibutuhkan GSH dalam jumlah besar, kadar GSH menjadi rendah pada kelompok kontrol positif. Peran GSH sebagai antioksidan adalah meredam hidrogen peroksida bersama dengan aktifitas enzim glutathione peroxidase. Di dalam proses ini GSH diubah menjadi bentuk teroksidasi GSSG. Selain hidrogen peroksida, GSH juga berperan dalam meredam peroksida lain seperti lipid peroksida. Kemampuan lain yang dimiliki oleh GSH sebagai antioksidan adalah GSH mampu memutus reaksi berantai dengan meredam radikal berbahaya yang terbentuk selama

reaksi berantai, diantaranya radikal hidroksil, radikal alkil, radikal DNA dan radikal DNA peroksil (Kidd P.M, 1997). Selain itu GSH juga mampu mempertahankan kadar vitamin C dalam tubuh oleh karena kemampuan GSH dalam merubah radikal askorbat menjadi bentuk asam askorbat (Kidd P.M, 1997).

Selain berperan sebagai antioksidan, GSH juga memiliki fungsi penting lain di dalam proses detoksifikasi toksin di hepar. Seperti diketahui, asap rokok selain mengandung radikal bebas dalam jumlah besar juga mengandung bahan-bahan yang bersifat toksin seperti nikotin, *polycyclic aromatic hydrocarbons* (PAH), dan akrolein. Toksisitas dari bahan-bahan tersebut karena sifat reaktifitasnya terhadap bagian nukleofilik dari asam amino dan DNA. Akibatnya bisa terjadi perubahan struktur dari molekul protein dan DNA sehingga mengakibatkan protein kehilangan fungsi biologis dan pada DNA terjadi mutasi gen (Bradfield, 1992).

GSH terlibat dalam fase II dari proses detoksifikasi bahan-bahan toksin di dalam jaringan hepar, yaitu dengan terlibat dalam proses konjugasi bahan toksin dengan melibatkan aktifitas dari enzim glutathione S-transferase. Sebagai contoh konjugasi GSH dengan akrolein dengan menggunakan enzim glutathione S-transferase akan menghasilkan kompleks *S-(2-Formylethyl)glutathione*. Kemudian kompleks ini dihidrolisis menghasilkan senyawa *S-(2-formylethyl)cysteine*, diubah lagi menjadi *N-Acetyl-S-(2-Formylethyl)cysteine*, kemudian diubah lagi menjadi *S-(3-hydroxypropyl)mercapturic acid*. Produk akhir ini nantinya diekskresi melalui urin (Bradfield, 1992). Dengan proses konjugasi ini maka bahan toksin tersebut berkurang toksitasnya dan menjadi mudah larut dalam air sehingga mudah diekskresi melalui urin dan cairan empedu (Kidd P.M, 1997).

Kemudian pada kelompok yang diberi ekstrak jinten hitam (kelompok A, B dan C) terjadi peningkatan kadar GSH baik pada jaringan paru maupun hepar. Hal ini disebabkan karena jinten hitam mengandung bahan aktif antara lain thymoquinon, carvacrol, t-anethol dan 4-terpineol. Dari beberapa penelitian sebelumnya bahan-bahan tersebut terbukti memiliki aktifitas sebagai antioksidan. Penelitian yang dilakukan oleh Burits & Bucar (2000) mengungkapkan bahwa, ke empat bahan tersebut memiliki aktifitas sebagai *OH radical scavenging*. Sedang penelitian yang dilakukan oleh Badary dkk (2000) yang menguji efek dari thymoquinon, lebih bersifat sebagai *anion superoxide scavenger* dibanding *terbutylhidroquinone*. Dengan demikian, radikal anion superoksid yang berasal dari paparan asap rokok akan dipungut/diredam oleh thymoquinon, sehingga pembentukan hidrogen peroksid yang berasal dari radikal anion superoksid oleh superoksid dismutase dapat dihambat. Akibatnya hidrogen peroksidanya rendah dan GSH banyak yang tidak terpakai.

Dengan banyaknya radikal bebas yang mampu diredam oleh jinten hitam maka GSH di dalam jaringan menjadi tidak terpakai sehingga kadarnya meningkat. Pada penelitian ini, peningkatan kadar GSH seiring dengan peningkatan dosis jinten hitam yang diberikan, hal ini menunjukkan bahwa efek antioksidan dari jinten hitam semakin kuat dengan peningkatan dosis. Dan kecenderungan ini tidak berbeda antara paru dan hepar. Justru perbedaan baru terlihat pada pemberian ekstrak jinten hitam pada dosis terkecil yaitu 0,6 gram/KgBB/hari, kadar GSH jaringan paru meningkat tidak bermakna dibandingkan kelompok kontrol positif, sedang pada hepar sudah terjadi peningkatan secara bermakna. Hal ini mungkin karena paru secara langsung berhubungan dengan paparan asap rokok yang diberikan, sehingga peningkatan ROS

di dalam paru jauh lebih besar dibandingkan dengan di hepar. Akibatnya stres oksidatif yang terjadi di paru mungkin lebih besar dibandingkan di hepar. Sebaliknya, ekstrak jinten hitam diberikan secara peroral (sonde), sehingga kemungkinan distribusi jinten hitam pada hepar lebih besar dibandingkan dengan paru. Oleh karena itu peningkatan kadar GSH di hepar sudah bermakna pada dosis kecil sedangkan di paru belum bermakna.

Hasil penelitian ini didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Ali B.H (2004) tentang efek minyak jinten hitam terhadap nefrotoksitas gentamycin pada tikus menunjukkan bahwa pemberian minyak jinten hitam dengan dosis 0,5 ml, 1ml dan 2 ml/KgBB/hari selama 10 hari dapat mencegah gejala nefrotoksitas pada tikus yang diinduksi gentamycin. Hal ini ditandai dengan peningkatan GSH jaringan korteks ginjal.

Percobaan yang lain dilakukan oleh El Dakhakhny terhadap fungsi protektif Nigella sativa pada sekresi ulkus gaster tikus yang diinduksi oleh ethanol. Tiga puluh dua tikus jantan digunakan di dalam penelitian ini. Induksi ethanol menghasilkan ulkus dengan *ulcer score* $12.62 +/- 1.35$. Hal ini mengakibatkan penurunan yang signifikan kadar glutathione dan peningkatan kadar histamin yang signifikan pula pada sekresi gaster. Sedangkan pada tikus yang diberi minyak Nigella sativa ternyata terdapat peningkatan signifikan kadar glutathione serta penurunan kadar histamin di dalam sekresi gasternya. (El Dakhakhny, 2000).

Dari hasil penelitian ini terbukti bahwa pemberian ekstrak jinten hitam dapat meningkatkan kadar GSH baik di jaringan paru maupun hepar tikus wistar yang dipapar asap rokok selama 1 bulan. Namun demikian masih perlu diteliti lebih lanjut

mengenai toksisitas jinten hitam sebelum digunakan sebagai salah satu alternatif antioksidan.



BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian di atas dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak jinten hitam dapat memberikan pengaruh positif terhadap kadar GSH paru dan GSH hepar tikus wistar yang dipapar asap rokok. Hal ini ditandai dengan peningkatan kadar GSH paru dan GSH hepar dari tikus wistar yang diberi perlakuan jinten hitam dibanding tanpa jinten. Peningkatan GSH disebabkan karena jinten hitam mengandung bahan-bahan yang bersifat antioksidan yang mampu meredam radikal bebas yang bersumber dari asap rokok. Dengan demikian pemberian ekstrak jinten hitam dapat mengurangi stres oksidatif pada jaringan paru dan hepar tikus akibat paparan asap rokok.

7.2 Saran

Dari hasil penelitian ini dapat disarankan beberapa hal:

1. Perlu diteliti lebih lanjut untuk memperdalam mekanisme thymoquinon yang terkandung dalam jinten hitam sebagai antioksidan, meskipun dugaan sementara menyatakan bahwa thymouinon memiliki aktifitas sebagai peredam radikal anion superoksid dan radikal hidroksil.
2. Perlu diteliti lebih lanjut tentang penggunaan jinten hitam sebagai antioksidan pada manusia mengenai cara pemberian, dosis efektif dan toksisitasnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Aditama TJ. 2000. **10 Masalah Tuberculosis dan Penanganannya.** *J. Respir. Indonesia* p 8 –12.
- Al Jassir, MS. 1992. **Chemical Composition of Black Cumin (*Nigella sativa*) Seed Growing in Saudi Arabia Food Chemistry.** *Saud. Arab.* p 239-242.
- Aoshiba K. Nagai A. 2003. **Oxidative Stress, Cell Death, and Other Damage to Alveolar Epithelial Cells Induced by Cigarette Smoke.** *Tobac. Induced disease.* vol 1 no 3. p 219 – 226.
- Aviesiena, 2000, **Primary Properties of Black Seed (Online),** (<http://www.blackseedusa.com/black.seed.htm>, diakses 20 Juni 2004).
- Badary OA. Gamal El din AM. 2001. **Inhibitory Effects of Thymoquinone against 20-methylcholanthrene-Induced Fibrosarcoma Tumorigenesis.** *Abstract Cancer Detect. Prev.* 25(4). p 362 – 368.
- Badary OA., Taha RA, Gamal el Din AM, Abdel Wahab, 2003. **Thymoquinone is A Potent Superoxide Anion Scavenger.** *Abstract of Drug. Chem. Tox.* 26(2). p 87 - 98.
- Basir FA. 1998. ***Nigella sativa*.** USA. Kesseli Lab. (Online) (<http://bio.umb.edu/index.htm>, diakses 12 Juni 2004).
- Boskabody HM. Shirmohammadi B. 2002. **Effect of *Nigella sativa* on Isolated Guinea Pig Trachea,** *Arch. of Iran. Med.*, vol 5.no 2. p 103 – 107.
- Burist M, Bucar F. 2000. **Antioxidant Activity of *Nigella sativa* Essential Oil.** *Abstract of Phytother.* 14(5). p 323 – 328.
- BPS. 1996. **Statistik Keséjahteraan Rakyat 1995.** Jakarta.
- Cerhan JR, 1998. **Cancer Mortality among Iowa farmers: recent result, time trends and lifestyle factors (United Stated).** *Cancer Causes Control*, 9 (3):311-319.
- Church DF and Pryor WA. 1985. **Free Radical Chemistry of Cigarette Smoke and its Toxicological Implications.** *Envir. Health Perspect.* 64. p 111 – 126.

- Comhair AAS. Erzurum CS. 2002. Antioxidant Responses to Oxidant Mediated Lung Disease. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiology.* Vol 283. p 246 – 255.
- Crofton J. 1990. Tobacco and The Third World. *Thorax.* 45. 164-169.
- Daba MH. Abdel Rahman MS. 1998. Hepatoprotective Activity of Thymoquinone in Isolates Rat Hepatocytes, *Abstract of Toxicol. Letter* 95(1). p 23 – 29.
- Djamhuri A. 1991. Perbedaan Gambaran Histologi Saluran Nafas Mencit pada Pemberian Asap Rokok Sigaret dan Kretek. *Majalah Farmakologi dan Terapi.* Vol 6 no 1 – 2. IKAIFI. Jakarta.
- Djamhuri A. 1992. Sisi Lain Farmakologi yang Terlupakan. Pidato Pengukuhan Guru Besar Ilmu Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Malang.
- El Dakhakhny M. Barakat M. El Halim MA. Aly SM. 2000. Effects of *Nigella sativa* oil on Gastric Secretion and Ethanol Induced Ulcer in Rats, *Abstract of J. Ethnopharm.* 72 (1-2). p 299 – 304
- Favier, AE. 1995. How to Demonstrate the Occurrence of an Oxidative Stress in Human? In: Analysis of Free Radical in Biological System. Switzerland: Birkhäuser Verlag. 1995. p 102-110.
- Garcia-Ruiz C, Colell A, Morales A, Kaplowitz N, Fernandes-Checa JC. 1995. Role of Oxidative Stress Generated from The Mitochondrial Electron Transport Chain and Mitochondrial Glutathione Status in Loss of Mitochondrial Function and Activation of Transcription Factor nuclear factor-kappa B: Studies with Isolated Mitochondria and Rat Hepatocytes. *Am. Soc. For Phar. and Exp. Ther.* Vol.48. Issue 5. p. 825-834.
- Guyton AC. 1994. Pernafasan dalam Buku Ajar Fisiologi Kedokteran. Penerbit Buku Kedokteran EGC Jakarta. p.149 – 209.
- Halliwell B. Gutteridge J. 1987. Oxidants and Human Disease: Some New Concept. *FASEB J* p. 358-364.
- Halliwell B. Gutteridge J. 1999. Free Radical in Biology and Medicine. Oxford: Oxford Science Publication. p 442 – 467.
- Hambali. 1987. Rokok dan PPOM. *Symposium Merokok dan Kesehatan.* Vol III. p 1 – 11.

- Hartati, IB. 2001. Pengaruh Ekstrak Jinten Hitam (*Nigella sativa*) Terhadap Gambaran Histopatologi Trachea pada Tikus Wistar dengan Diet Atherogenik (*Skripsi*). Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
- Houghton PJ, Zarka R, De Las Heras B, Hoult JR. 2000. Fixed Oil of *Nigella Sativa* and Derived Thymoquinone Inhibit Eicosanoid Generation in Leucocytes and Membranes Lipid Peroxidation. *Abstract Planta Med.* 61 (1) p:33-36.
- Higgins JE and Kleinbaum AP. 1985. Determining Sample Size in Introduction to Randomized Clinical Trials (Higgins JE. Eds). USA: Fam . Health Intern. p: 24-35.
- Kalpana C and Menon VP. 2004. Modulatory Effect of Curcumin on Lipid Peroxidation and Antioxidant Status During Nicotine-Induced Toxicity. *Polish J. of Pharm.* 56. p. 581-586.
- Kehrer JP and Biswal S. 2000. The Molecular Effect of Acrolein. *Toxic. Sciences* 57. p. 6-15.
- Kelly, FJ. 2003. Oxidative Stress: Its Role in Air Pollution and Adverse Health Effects. *Occup. Envir. Med.* 60. p 612 – 616.
- Kidd PM. 1997. Gluthatione: Systemic Protectant Against Oxidative and Free Radical Damage. *Alt. Med. Rev.* 2(3):p. 155-176.
- Levy G. 1986. Sulfate Conjugation in Drug Metabolism: Role of Inorganic Sulfate. *Fed. Proceeding.* 45 (8): p. 2235-2240.
- Lluis JM, Morales A, Blasco C, Colell A, Mari M, Garcia-Ruiz C and Fernandes-Checa JC. 2005. Critical Role of Mitochondrial Gluthatione in The Survival of Hepatocytes During Hypoxia. *J. Biol. Chem.* Vol. 280. Issue 5. p. 3224-3232.
- MacNee W, Rahman I. 1999. Oxidant and Antioxidant as Therapeutic Targets in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* vol 160. p S58 – S65.
- MacNee W. 2005. Pulmonary and Systemic Oxidant / Antioxidant Imbalance in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proc. Am. Thorac. Soc.* Vol. 2 p. 50-60.
- Martensson J, Jain A, Frayer W and Meister A. 1989. Gluthatione Metabolism in The Lung: Inhibition of Its Synthesis Leads to Lamellar Body and Mitochondrial Defect. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA (Biochemistry)* Vol. 86 p.5296-5300.

McGraw H. **Chemical Carcinogenesis.**, in "Cassarette and Doull's Toxicology, The Basic Poisons. CD Klassen ed 5th Edition. San Fransisco. p:201-267.

McKinnon RA, McManus ME. 1996. **Localization of Cytochromes P450 in Human Tissues: Implications for Chemical Toxicity.** *Pathology*.28. p. 148-155.

Mitacek AJ, Bruennemann KP, Hoffmann D, Limsila T, Sutajit M, Martin and GP Ian CS. 1999. **Volatile Nitrosamine and Tobacco Specific Nitrosamine in The Smoke of Thai Cigarettes: a Risk Factor for Lung cancer and a Suspected Risk Factor for Liver Cancer in Thailand.** *J. Carcinogenesis*. 20 (1) :p. 133-137.

Pagola S, Benavente A, Raschi A, Romano E, Molina M.A.A, and Stephens P.W. 2003. **Crystal Structure Determination of Thymoquinone by High-Resolution X-Ray Powder Diffraction.** *AAPS Pharm. Sci. Tech.*; 5 (2) Article 28 (<http://www.aapspharmscitech.org>).

Rahman I., MacNee W. 1999. **Lung Glutathione and Oxidative Stress; Implication in Cigarette Smoke Induced Airway Disease.** *Am. J. of Lung Physiol.* Vol 277. p 1067 – 1088.

Repine EJ dkk. 1997. **Oxidative Stres in Chronic Obstructive Pulmonary Disease.** *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* Vol. 156. p. 341-357.

Shapiro SD. 2000. **Animal Models for COPD.** *Chest* 117. p 223S– 227S.

Shoker A. Mohamed A. 2003. **Improvement of Experimental Allergic Encephalitis (EAE) by Thymoquinone; an Oxidative Stress Inhibitor.** *Abstract of Biomed. Sci. Instr.* 39. p 440 – 445.

Sies H. 1991. **Oxidative Stress II.** In: **Oxidant and Antioxidants.** Academic Press. London.

Sumintarti. 1997. **Pengaruh Asap rokok dan Stres terhadap Respon Imun Mencit.** *Disertasi.* Program Pascasarjana. Universitas Airlangga. Surabaya.

Suryohudoyo P. 2000. **Kapita Selekta Ilmu Kedokteran Molekuler, Sagung Seto.** Jakarta. p 31 – 47.

WHO. 2000. **WHO Reports.** World Health Organization.

Widodo MA. 1996. **Radikal Bebas dan Peranannya dalam Patogenes Penyakit dan Penuaan.** *Seminar Free Radical Update.* Malang.

Wu Y, Zhang X, Bardag-Gorce F, Robel RCV, Aguiló J, Chen L, Zeng Y, Hwang K, French SW, Lu SC and Wan Y. 2004. **Retinoid X Receptor α Regulates Glutathione Homeostasis and Xenobiotic Detoxification Processes in Mouse Liver.** *Mol. Pharm.* 65: p. 550-557.

Yuan MJ, Ross RK. 1996. **Morbidity and Mortality in Relation to Cigarette Smoking in Shanghai- China.** *JAMA*. 275 (21). p.1646-1650.

Yueniwati Y, 2000. **Pengaruh Paparan Asap Rokok Kretek terhadap Aktifitas Radikal Bebas Mikrosom Hepar yang Menginduksi Sitokrom P450 IAI.** *Tesis. Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.*



Lampiran 1

Penghitungan Dosis Ekstrak Jinten Hitam

- Hasil ekstraksi dari 300 gr jinten hitam → 180 cc minyak jinten hitam ≈ 167 gr ekstrak jinten hitam.

$$\rightarrow \frac{167}{300} \times 100\% = 55,67\% \approx 56\%$$

Δ 1 gram biji jinten hitam → 0,56 gram ekstrak jinten hitam.

$$\rightarrow 180 \text{ cc} \approx 167 \text{ gram ekstrak jinten}, \frac{167}{180} \times 100\% = 93\%$$

Δ 1 cc ≈ 0,93 gram ekstrak jinten hitam

- Hitungan dosis tikus yang digunakan dalam penelitian ini:

- Dosis 1 : 0,6gr / kgBB / hr → 0,645 cc / kgBB → 0,1 cc/hr
- Dosis 2 : 1,2 gr / kgBB / hr → 1,3 cc / kgBB → 0,2 cc/hr
- Dosis 3 : 2,4 gr / kgBB / hr → 2,6 cc / kgBB → 0,45 cc/hr

Lampiran 2

Jadwal Rencana Kegiatan Penelitian

No	KEGIATAN	BULAN											
		OKT 2004	NOP 2004	DES 2004	JAN 2005	FEB 2005	MARET 2005	APRIL 2005	MEI 2005	JUNI 2005	JULI 2005	AGST 2005	
1	Studi Kepustakaan	.											
2	Pembuatan Proposal												
3	Konsultasi & Koreksi Proposal												
4	Persiapan Ujian Proposal												
5	Ujian Proposal												
6	Persiapan Penelitian												
7.	Pelaksanaan Penelitian												
8	Pembahasan Hasil dan Konsultasi												
9	Persiapan Ujian Tesis												
10	Ujian Tesis												
11	Perbaikan & Penyerahan Hasil Tesis												

Lampiran 3

Rencana Biaya Penelitian

1. Pembuatan Proposal dan Naskah Tesis

Pencarian bahan di internet	Rp. 500.000,00
Analisis Data	Rp. 500.000,00
Fotokopi & Penjilidan	Rp. 500.000,00

2. Hewan Coba Untuk Penelitian

Tikus strain Wistar usia 2-3 bulan 50 buah @ Rp. 25.000,00	Rp. 1.250.000,00
Biaya pemeliharaan per hari Rp 500,00 x 50 ekor x 50 hari	Rp. 1.250.000,00
Pembuatan kandang	Rp. 200.000,00

3. Bahan Penelitian

Biji Jinten Hitam 1 kg	Rp. 50.000,00
Ekstraksi Jinten Hitam	Rp. 150.000,00
Rokok @ Rp. 40.000,00 x 3 slop	Rp. 120.000,00

4. Peralatan Penelitian

Sewa "smoking pump"	Rp. 500.000,00
Perfusion set	Rp. 50.000,00
Sonde	Rp. 100.000,00
Pisau bedah	Rp. 25.000,00
Gunting	Rp. 25.000,00
Pinset	Rp. 25.000,00
Spuit injection @ Rp. 3.000,00 x 10 buah	Rp. 30.000,00
Ketamine injection 2 vial/ 20 cc	Rp. 200.000,00
Botol tempat sampel @ Rp.1.000,00 x 60	Rp. 60.000,00

5. Pembuatan sediaan /preparasi jaringan paru @Rp. 10.000,00 x 60

Rp. 600.000,00

6. Pemeriksaan GSH paru @Rp. 75.000 x 30

Rp. 2.250.000,00

7. Pemeriksaan GSH hepar @ Rp.75.000 x 30

Rp. 2.250.000,00

8. Dokumentasi

Rp. 100.000,00

9. Biaya pengeluaran lain-lain

Pemeliharaan alat/ sterilisasi	Rp. 500.000,00
Honorarium Perawat + Laboran	Rp. 500.000,00
Transportasi	Rp. 500.000,00

JUMLAH

Rp. 9.625.000,00

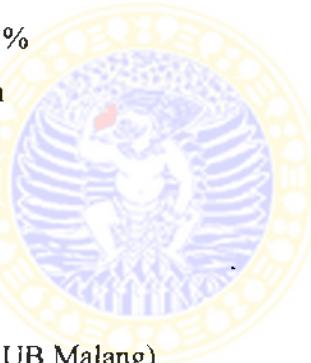
Terbilang : Sembilan Juta Enam Ratus Dua Puluh Lima Ribu Rupiah

Lampiran 4

KOMPOSISI PAKAN TIKUS (200 gr)

Air	12 %
Protein	11 %
Lemak	4 %
Serat	7 %
Abu	8 %
Kalsium	0,9- 1 %
Fosfor	0,7 – 0,9 %
Terigu	100 gram
Kalori	365 kal
Protein	41,6
Lemak	27,81
Karbohidrat	275,16

(Sumber: Lab. Farmakologi FKUB Malang)



Lampiran 5

CARA PERFUSI PARU DAN HEPAR IN SITU

- Menyiapkan seperangkat infus set dimana pada ujung selangnya sudah ditambah dengan selang kecil dari *naso gastric tube* neonatus yang dipotong.
- Menyiapkan larutan untuk perfusi berupa larutan kreb's pH 7,4 suhu 37°C. Lalu dimasukkan ke dalam botol infus yang sudah terpasang
- Tikus dianestesi dengan ketamin injeksi dengan dosis 50 mg/KgBB.
- Tikus disiapkan di atas meja kecil dengan posisi terlentang, pada kedua kaki dan tangan ditusukkan jarum agar tikus terikat erat di meja.
- Membuka dinding perut tikus mulai kulit, jaringan sub kulit samapi terlihat peritoneum, kemudian diperluas sampai ke bagian dada hingga tampak hepar, jantung dan paru. Kemudian kulit yang terbuka tadi di klem dan ditarik ke arah superior.
- Mencari vena cava inferior, kemudian dipotong sebagian dinding vena, hati-hati jangan sampai terputus,lalu dengan bantuan pinset kecil ujung selang dari infus set dimasukkan ke dalam vena cava dan infus dijalankan.
- Selang difiksasi dengan kuat pada venanya agar tidak terlepas selama perfusi berlangsung dan tunggu proses perfusi sampai kurang lebih 5 menit, paru terlihat putih bersih dan hepar tampak coklat muda.
- Perfusi selesai lalu potong jaringan paru dan hepar yang sudah bersih, simpan di dalam freezer hingga siap digunakan pada pemeriksaan selanjutnya.

Lampiran 6

Komposisi larutan untuk perfusi (larutan kreb's pH 7,4 suhu 37°C)

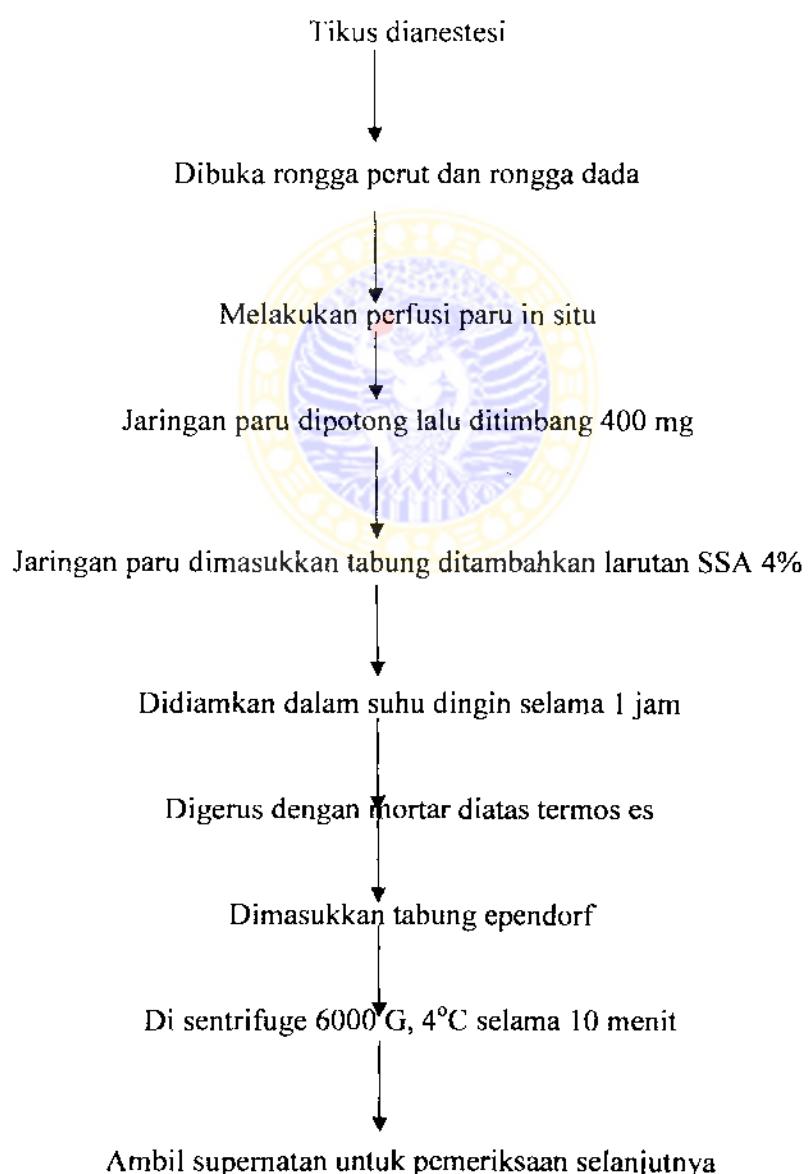
Dalam 1 liter larutan terdiri dari:

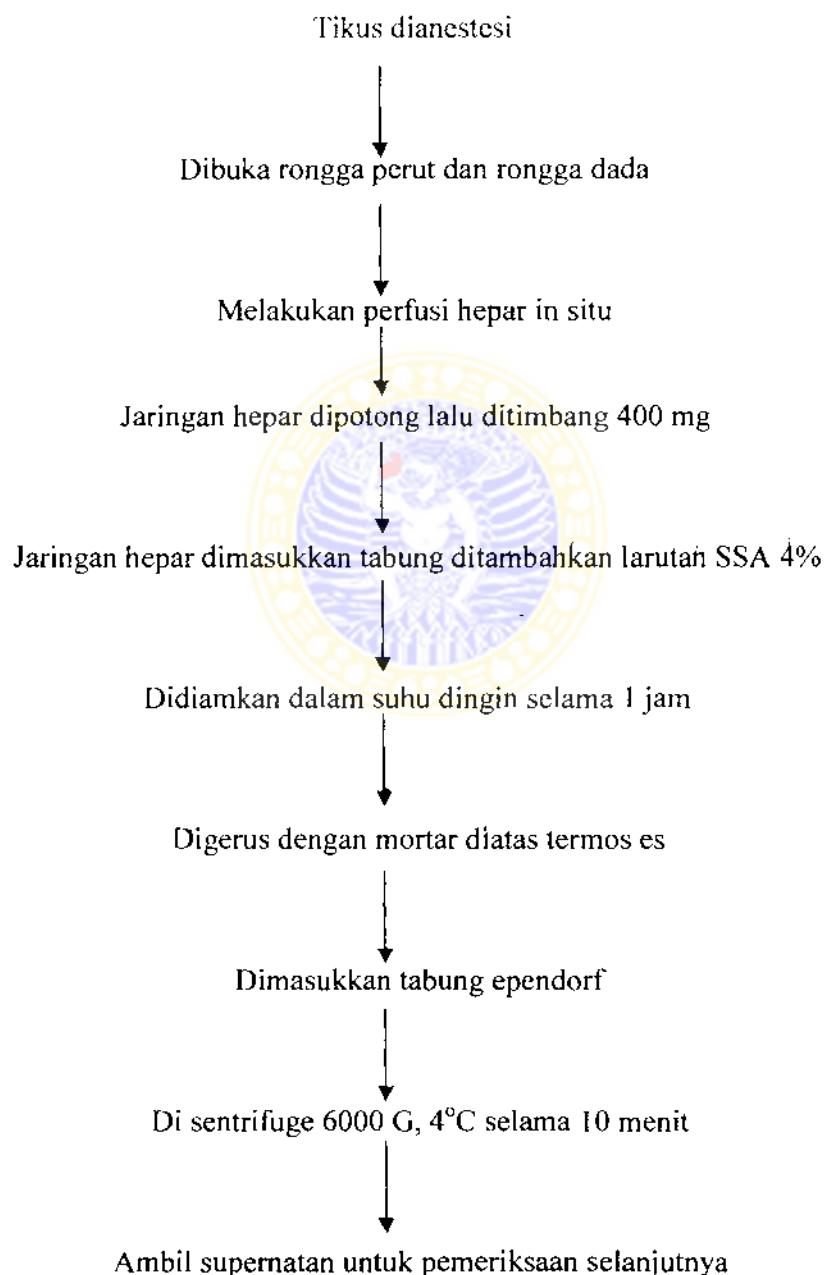
- NaCl 0,9 g
- KCl 0,35 g
- MgSO₄ 0,29 g
- CaCl₂ 0,28 g
- KH₂PO₄ 0,17 g
- NaHCO₃ 2 g
- Glukosa 2 g



Lampiran 7

PREPARASI JARINGAN PARU



Lampiran 8**PREPARASI JARINGAN HEPAR**

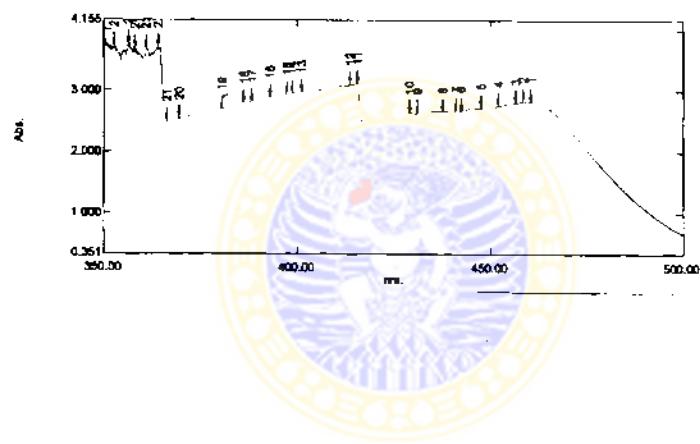
Lampiran 9

Panjang Gelombang Maksimum dan Kurva Baku GSH

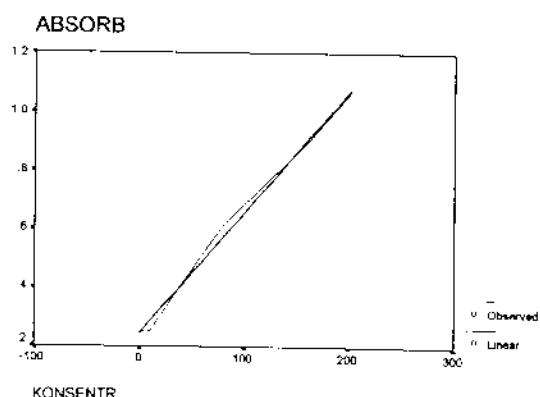
A. Panjang Gelombang Maksimum GSH

Spectrum Peak Pick Report

Data Set: Storage 140901 - rawData - C:\Program Files\SHIMADZU\UVProbe\ rawData\SPC
UNIBRAWAGSH REV1 UNIBRAW 230505_2.spc



B. Kurva Baku GSH



General Linear Model

Between-Subjects Factors

	N
PLK 0	5
1	6
2	6
3	6
4	5

Multivariate Tests^c

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	.998	5756.041 ^a	2.000	22.000	.000
	Wilks' Lambda	.002	5756.041 ^a	2.000	22.000	.000
	Hotelling's Trace	523.276	5756.041 ^a	2.000	22.000	.000
	Roy's Largest Root	523.276	5756.041 ^a	2.000	22.000	.000
PLK	Pillai's Trace	1.318	11.122	8.000	46.000	.000
	Wilks' Lambda	.019	34.228 ^a	8.000	44.000	.000
	Hotelling's Trace	33.564	88.106	8.000	42.000	.000
	Roy's Largest Root	33.031	189.928 ^b	4.000	23.000	.000

a. Exact statistic

b. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

c. Design: Intercept+PLK

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	GSHP	1.700 ^a	4	.425	37.461	.000
	GSHH	1.570 ^b	4	.392	71.496	.000
Intercept	GSHP	3.372	1	3.372	297.268	.000
	GSHH	42.796	1	42.796	7797.847	.000
PLK	GSHP	1.700	4	.425	37.461	.000
	GSHH	1.570	4	.392	71.496	.000
Error	GSHP	.261	23	.011		
	GSHH	.126	23	.005		
Total	GSHP	5.058	28			
	GSHH	43.666	28			
Corrected Total	GSHP	1.960	27			
	GSHH	1.696	27			

a. R Squared = .867 (Adjusted R Squared = .844)

b. R Squared = .926 (Adjusted R Squared = .913)

Descriptives

Descriptive Statistics

	N	Range	Minimum	Maximum	Mean	
	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error
GSHP	28	.952	.025	.977	.33261	5.092E-02
GSHH	28	.929	.751	1.680	1.22432	4.736E-02
PLK	29	4	0	4	2.07	.26
Valid N (listwise)	28					

Descriptive Statistics

	Std.	Variance	Skewness		Kurtosis	
	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic	Std. Error
GSHP	.26946	7.261E-02	.873	.441	-.115	.858
GSHH	.25061	6.281E-02	.086	.441	-.328	.858
PLK	1.41	1.995	-.049	.434	-1.267	.845
Valid N (listwise)						

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		GSHP	GSHH	PLK
N		28	28	29
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	.33261	1.22432	2.07
	Std. Deviation	.26946	.25061	1.41
Most Extreme Differences	Absolute	.127	.100	.159
	Positive	.122	.100	.155
	Negative	-.127	-.088	-.159
Kolmogorov-Smirnov Z		.671	.529	.856
Asymp. Sig. (2-tailed)		.758	.942	.457

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Means

Case Processing Summary

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
GSHP * PLK	28	93.3%	2	6.7%	30	100.0%
GSHH * PLK	28	93.3%	2	6.7%	30	100.0%

Report

PLK	GSHP	GSHH
0 Mean	.80778	1.62237
N	5	5
Std. Deviation	.10218	5.055E-02
1 Mean	8.980E-02	.88356
N	6	6
Std. Deviation	5.756E-02	.10300
2 Mean	.14575	1.17732
N	6	6
Std. Deviation	.12619	6.313E-02
3 Mean	.36760	1.18912
N	6	6
Std. Deviation	.11998	8.309E-02
4 Mean	.33104	1.33379
N	5	5
Std. Deviation	.11284	4.613E-02
Total Mean	.33261	1.22432
N	28	28
Std. Deviation	.26946	.25061

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) PLK	(J) PLK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
GSHP	0	1	.71798*	.064488	.000	.52735	.90861
		2	.66203*	.064488	.000	.47140	.85266
		3	.44018*	.064488	.000	.24955	.63081
		4	.47674*	.067356	.000	.27763	.67585
	1	0	-.71798*	.064488	.000	-.90861	-.52735
		2	-.05595	.061487	.890	-.23771	.12581
		3	-.27780*	.061487	.001	-.45956	-.09604
		4	-.24124*	.064488	.009	-.43187	-.05061
	2	0	-.66203*	.064488	.000	-.85266	-.47140
		1	.05595	.061487	.890	-.12581	.23771
		3	-.22185*	.061487	.012	-.40361	-.04009
		4	-.18529	.064488	.060	-.37592	.00534
	3	0	-.44018*	.064488	.000	-.63081	-.24955
		1	.27780*	.061487	.001	.09604	.45956
		2	.22185*	.061487	.012	.04009	.40361
		4	.03656	.064488	.979	-.15407	.22719
	4	0	-.47674*	.067356	.000	-.67585	-.27763
		1	.24124*	.064488	.009	.05061	.43187
		2	.18529	.064488	.060	-.00534	.37592
		3	-.03656	.064488	.979	-.22719	.15407
GSHH	0	1	.73881*	.044859	.000	.60621	.87142
		2	.44505*	.044859	.000	.31245	.57766
		3	.43326*	.044859	.000	.30065	.56586
		4	.28858*	.046854	.000	.15008	.42709
	1	0	-.73881*	.044859	.000	-.87142	-.60621
		2	-.29376*	.042771	.000	-.42019	-.16733
		3	-.30556*	.042771	.000	-.43199	-.17912
		4	-.45023*	.044859	.000	-.58283	-.31762
	2	0	-.44505*	.044859	.000	-.57766	-.31245
		1	.29376*	.042771	.000	.16733	.42019
		3	-.01180	.042771	.999	-.13823	.11464
		4	-.15647*	.044859	.015	-.28907	-.02386
	3	0	-.43326*	.044859	.000	-.56586	-.30065
		1	.30556*	.042771	.000	.17912	.43199
		2	.01180	.042771	.999	-.11464	.13823
		4	-.14467*	.044859	.028	-.27728	-.01207
	4	0	-.28858*	.046854	.000	-.42709	-.15008
		1	.45023*	.044859	.000	.31762	.58283
		2	.15647*	.044859	.015	.02386	.28907
		3	.14467*	.044859	.028	.01207	.27728

Based on observed means.

* The mean difference is significant at the .05 level.

GSHP

Tukey HSD^{a,b,c}

PLK	N	Subset			
		1	2	3	4
1	6	.08980			
2	6	.14575	.14575		
4	5		.33104	.33104	
3	6			.36760	
0	5				.80778
Sig.		.903	.056	.978	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = .011.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.556.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

c. Alpha = .05.

GSHH

Tukey HSD^{a,b,c}

PLK	N	Subset			
		1	2	3	4
1	6	.88356			
2	6		1.17732		
3	6		1.18912		
4	5			1.33379	
0	5				1.62237
Sig.		1.000	.999	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = .005.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.556.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

c. Alpha = .05.

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

	N
PLK 0	5
1	6
2	6
3	6
4	5

Descriptive Statistics

Dependent Variable: GSHP

PLK	Mean	Std. Deviation	N
0	.80778	.10218	5
1	8.980E-02	5.7562E-02	6
2	.14575	.12619	6
3	.36760	.11998	6
4	.33104	.11284	5
Total	.33261	.26946	28

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: GSHP

F	df1	df2	Sig.
1.141	4	23	.362

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept+PLK

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: GSHP

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1.700 ^a	4	.425	37.461	.000
Intercept	3.372	1	3.372	297.268	.000
PLK	1.700	4	.425	37.461	.000
Error	.261	23	1.134E-02		
Total	5.058	28			
Corrected Total	1.960	27			

a. R Squared = .867 (Adjusted R Squared = .844)

Estimated Marginal Means

PLK

Dependent Variable: GSHP

PLK	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
0	.808	.048	.709	.906
1	8.980E-02	.043	-1.412E-04	.180
2	.146	.043	5.581E-02	.236
3	.368	.043	.278	.458
4	.331	.048	.233	.430

Multiple Comparisons

Dependent Variable: GSHP

Tukey HSD

(I) PLK	(J) PLK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0	1	.71798*	6.449E-02	.000	.52735	.90861
	2	.66203*	6.449E-02	.000	.47140	.85266
	3	.44018*	6.449E-02	.000	.24955	.63081
	4	.47674*	6.736E-02	.000	.27763	.67585
1	0	-.71798*	6.449E-02	.000	-.90861	-.52735
	2	-5.5950E-02	6.149E-02	.890	-.23771	.12581
	3	-.27780*	6.149E-02	.001	-.45956	-9.60398E-02
	4	-.24124*	6.449E-02	.009	-.43187	-5.06083E-02
2	0	-.66203*	6.449E-02	.000	-.85266	-.47140
	1	5.5950E-02	6.149E-02	.890	-.12581	.23771
	3	-.22185*	6.149E-02	.012	-.40361	-4.00898E-02
	4	-.18529	6.449E-02	.060	-.37592	5.3417E-03
3	0	-.44018*	6.449E-02	.000	-.63081	-.24955
	1	.27780*	6.149E-02	.001	9.6040E-02	.45956
	2	.22185*	6.149E-02	.012	4.0090E-02	.40361
	4	3.6560E-02	6.449E-02	.979	-.15407	.22719
4	0	-.47674*	6.736E-02	.000	-.67585	-.27763
	1	.24124*	6.449E-02	.009	5.0608E-02	.43187
	2	.18529	6.449E-02	.060	-5.34172E-03	.37592
	3	-3.6560E-02	6.449E-02	.979	-.22719	.15407

Based on observed means.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

GSHP

Tukey HSD^{a,b,c}

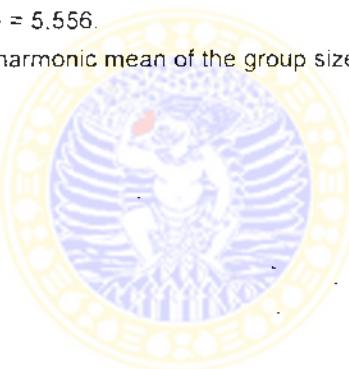
PLK	N	Subset			
		1	2	3	4
1	6	8.980E-02			
2	6	.14575	.14575		
4	5		.33104	.33104	
3	6			.36760	
0	5				.80778
Sig.		.903	.056	.978	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 1.134E-02.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.556.
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.
- c. Alpha = .05.



Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

	N
PLK 0	5
1	6
2	6
3	6
4	5

Descriptive Statistics

Dependent Variable: GSHH

PLK	Mean	Std. Deviation	N
0	1.62237	5.0554E-02	5
1	.88356	.10300	6
2	1.17732	6.3134E-02	6
3	1.18912	8.3093E-02	6
4	1.33379	4.6128E-02	5
Total	1.22432	25061	28

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: GSHH

F	df1	df2	Sig.
1.882	4	23	.148

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups

a. Design: Intercept+PLK

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: GSHH

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1.570 ^a	4	.392	71.496	.000
Intercept	42.796	1	42.796	7797.847	.000
PLK	1.570	4	.392	71.496	.000
Error	.126	23	5.488E-03		
Total	43.666	28			
Corrected Total	1.696	27			

a. R Squared = .926 (Adjusted R Squared = .913)

Estimated Marginal Means

PLK

Dependent Variable: GSHH

PLK	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
0	1.622	.033	1.554	1.691
1	.884	.030	.821	.946
2	1.177	.030	1.115	1.240
3	1.189	.030	1.127	1.252
4	1.334	.033	1.265	1.402

Multiple Comparisons

Dependent Variable: GSHH

Tukey HSD

(I) PLK	(J) PLK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0	1	.73881*	4.486E-02	.000	.60621	.87142
	2	.44505*	4.486E-02	.000	.31245	.57766
	3	.43326*	4.486E-02	.000	.30065	.56586
	4	.28858*	4.685E-02	.000	.15008	.42709
1	0	-.73881*	4.486E-02	.000	-.87142	-.60621
	2	-.29376*	4.277E-02	.000	-.42019	-.16732
	3	-.30556*	4.277E-02	.000	-.43199	-.17912
	4	-.45023*	4.486E-02	.000	-.58283	-.31762
2	0	-.44505*	4.486E-02	.000	-.57766	-.31245
	1	.29376*	4.277E-02	.000	.16732	.42019
	3	-.11796E-02	4.277E-02	.999	-.13823	.11464
	4	-.15647*	4.486E-02	.015	-.28908	-2.38624E-02
3	0	-.43326*	4.486E-02	.000	-.56586	-.30065
	1	.30556*	4.277E-02	.000	.17912	.43199
	2	1.1796E-02	4.277E-02	.999	-.11464	.13823
	4	-.14467*	4.486E-02	.028	-.27728	-1.20664E-02
4	0	-.28858*	4.685E-02	.000	-.42709	-.15008
	1	.45023*	4.486E-02	.000	.31762	.58283
	2	.15647*	4.486E-02	.015	2.3862E-02	.28908
	3	.14467*	4.486E-02	.028	1.2066E-02	.27728

Based on observed means.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

GSHH

Tukey HSD^{a,b,c}

PLK	N	Subset			
		1	2	3	4
1	6	.88356			
2	6		1.17732		
3	6		1.18912		
4	5			1.33379	
0	5				1.62237
Sig.		1.000	.999	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 5.488E-03.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.556.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

c. Alpha = .05.

