

**UJI KEAMANAN SEDIAAN  
MENGANDUNG EKSTRAK PEGAGAN,  
KELOR, DAN JINTAN HITAM TERHADAP  
DAYA HIDUP, HEMOGRAN DAN FUNGSI HATI**

Dr. dr. Akrom, M.Kes.  
Dr.dr. Titiek Hidayati, M.Kes.  
Dr.Apt. Arif Budi Setianto, M.Si.



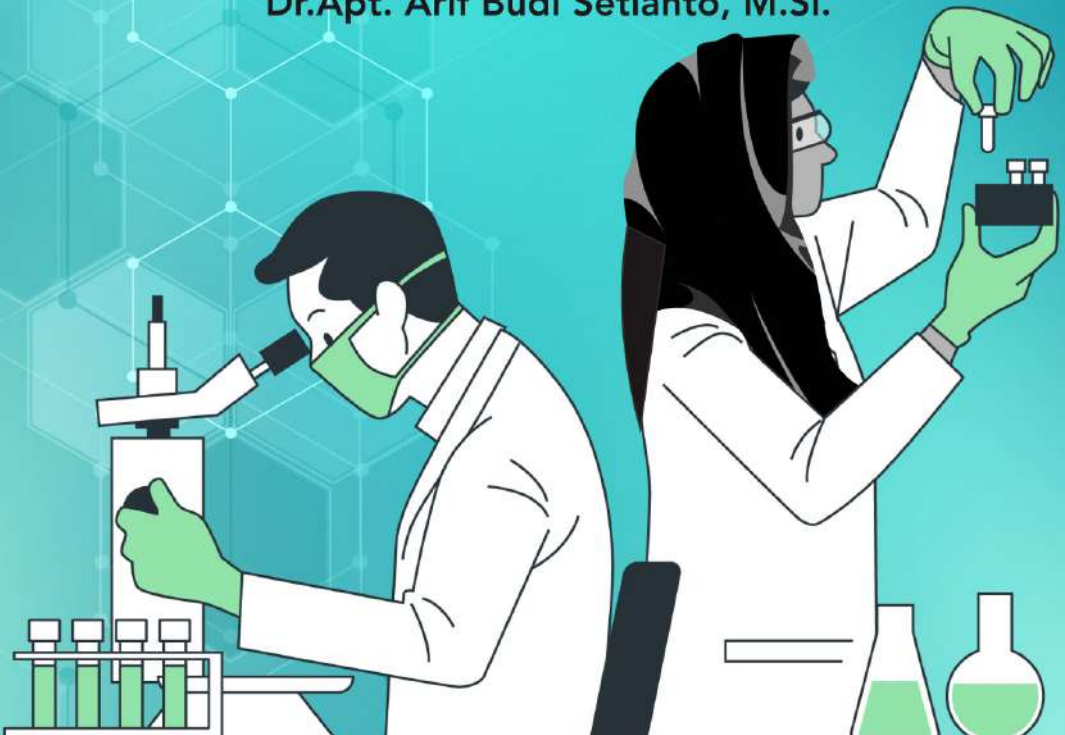
*Buku ini dipersembahkan untuk*

.....

Hak cipta dilindungi Undang-undang No. 28 Tahun 2014  
Dilarang mengutip atau memperbanyak sebagian  
atau seluruh isi buku ini tanpa seizin tertulis dari penerbit

**UJI KEAMANAN SEDIAAN  
MENGANDUNG EKSTRAK PEGAGAN,  
KELOR, DAN JINTAN HITAM TERHADAP  
DAYA HIDUP, HEMOGRAN DAN FUNGSI HATI**

**Dr. dr. Akrom, M.Kes.  
Dr.dr. Titiek Hidayati, M.Kes.  
Dr.Apt. Arif Budi Setianto, M.Si.**



# UJI KEAMANAN SEDIAAN MENGANDUNG EKSTRAK PEGAGAN, KELOR DAN JINTAN HITAM TERHADAP DAYA HIDUP, HEMOGRAM DAN FUNGSI HATI

Kegiatan ini dibiayai oleh kementerian Pendidikan kebudayaan riset dan teknologi serta BRIN nomor kontra003/SK.PJT/LPPM/VII/2021k

Penulis : Dr. dr. Akrom, M.Kes.  
          : Dr.dr. Titiek Hidayati, M.Kes.  
          : Dr.Apt. Arif Budi Setianto, M.Si.  
Penata Letak : Tim Azkiya  
Desain Sampul : Tim Azkiya

Penerbit:



Perum Bukit Golf, Arcadia Housing  
Blok E 5 No 21 dan F6 No 10 Leuwinanggung,  
Gunung Putri, Bogor, 16963  
*E-mail* : nennyrcho2@yahoo.com  
[www.noorhanilaksmi.wordpress.com](http://www.noorhanilaksmi.wordpress.com)

Cetakan:

I. Jakarta, 2021

Katalog dalam terbitan (KDT)

Dr. dr. Akrom, M.Kes. dkk./Uji Keamanan Sediaan Mengandung  
Ekstrak Pegagan, Kelor Dan Jintan Hitam Terhadap Daya Hidup,  
Hemogram Dan Fungsi Hati  
- Cet. 1. - Jakarta: November 2021  
iv + 90 hlm.; ilus.; 23 cm.  
Bibliografi: 62  
ISBN : 978-623-5733-17-3

**NASKAH AKADEMIK HASIL UJI KETOKSIKAN  
AKUT DAN SUB KRONIK SEDIAAN  
MENGANDUNG EKSTRAK PEGAGAN, EKSTRAK  
KELOR DAN MINYAK JINTEN HITAM**



Oleh :

**Dr. dr. Akrom, M.Kes. (NIDN:0506076701)**

**Dr.dr. Titiek Hidayati, M.Kes. (NIDN: 0508096802)**

**Dr.Apt. Arif Budi setianto, M.Si.**

**KERJASAMA UAD DAN UMY  
YOGYAKARTA**

**2021**

# KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum warahmatullahi wabarakatuh

*Alhamdulillahirabbil'aalamiin*, dengan rahmat Allah Swt Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, puji syukur penuli panjatkan kehadiran Allah SWT yang telah memberikan dan menganugerahkan kasih sayang, rezeki, dan kesehatan serta atas berkah, ridha, dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan buku yang berjudul “UJI KEAMANAN SEDIAAN MENGANDUNG EKSTRAK PEGAGAN, KELOR DAN JINTAN HITAM TERHADAP DAYA HIDUP, HEMOGRAM DAN FUNGSI HATI”. Shalawat serta salam penulis panjatkan untuk Nabi Muhammad SAW yang mengantarkan umatnya dari zaman kebodohan menuju ke zaman yang terang benderang seperti sekarang ini, serta yang telah menjadi tauladan untuk umat Islam menjalankan perintah-Nya dan menjauhi larangan-Nya.

Penulisan buku ini merupakan bentuk tanggung jawab atas keluaran penelitian PTUPT dengan pembiayaan dari Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, dan Riset Teknologi RI dengan no. NOMOR: 003/SK.PJT/LPPM/VII/2021. Tim penulis menyadari bahwa dalam penyusunan buku ini masih ada kekurangan dan kesalahan, maka dari itu, penulis dengan penuh kerendahan hati mengharapkan kritik dan saran dari berbagai pihak untuk dijadikan bahan masukan dan evaluasi untuk perbaikan dan kesempurnaan penulisan buku ditahap berikutnya.

Buku ini dapat terselesaikan karena adanya kerja keras, tanggung jawab untuk menyelesaikan tugas dan tanggung jawab ini dan tidak terlepas dari doa, bimbingan dan dukungan dari berbagai pihak, serta

kritik dan saran yang membantu terselesaikannya penulisan buku ini. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah memberikan bantuan pendanaan, fasilitas, Kerjasama dan dukungan doa sehingga penelitian dan penyusunan buku ini dapat diselesaikan. Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya terutama diberikan kepada:

1. Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, dan Riset Teknologi RI dan BRIN yang telah memberikan pembiayaan penelitian kami yang berjudul “CORSAVE OHT SUPLEMEN KARDIOPROTEKTOR UNTUK PASIEN DIABETES MELLITUS DAN HIPERTENSI DI PUSKESMAS”
2. Pimpinan UAD dan Pimpinan LPPM UAD yang telah memberikan berbagai fasilitas, dan sarana prasarana sehingga tugas penelitian ini dapat Kami laksanakan.
3. Semua anggota TIM, Pimpinan dan staf Laboran di UPHP UGM, para mahasiswa dan laboran di laboratorium Biologi farmasi UAD dan UMY serta laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas farmasi UAD yang telah bersedia bekerjasama dan mendukung program penelitian ini.

*Akhirulkalimat*, saya berharap semoga Allah Swt berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah mendukung dan membantu Tim dalam menyelesaikan buku ini. Semoga buku ini membawa manfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan, *Amiiin*.

Wassalamu’alaikum Warahmatullah Wabarakatuh.

Yogyakarta, Agustus 2021

Penulis

# DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	2
BAB I PENDAHULUAN	5
BAB II METODE PENELITIAN	10
BAB III HASIL UJI KETOKSIKAN AKUT DAN PEMBAHASAN	27
BAB IV HASIL UJI KETOKSIKAN SUBKRONIK	32
DAFTAR PUSTAKA	62
DAFTAR RIWAYAT HIDUP PENULIS	88



# BAB I

## PENDAHULUAN

### A. Latar Belakang

Secara empiris madu, minyak jinten hitam, pegagan dan kelor diketahui memiliki banyak manfaat. Minyak biji jinten hitam secara empiris telah dimanfaatkan sebagai penguat sistem kekebalan atau imunomodulator. Minyak biji jinten hitam banyak mengandung minyak asiri yang mudah menguap, dengan kandungan utama timokuinon, telah dibuktikan sebagai antiinflamasi, imunomodulator, antioksidan, serta hepatoprotektor. Herba pegagan secara empiris telah dimanfaatkan sebagai tanaman obat dengan berbagai aktifitas biologis antara lain sebagai antioksidan, antipenuaan, imunostimulansia dan neuroprotektor. Kelor adalah salah satu tanaman dengan daun memiliki kandungan nutrisi lengkap, baik mikro maupun makronutrient. Secara laboratorik Pegagan maupun Kelor telah terbukti bersifat antioksidatif, kardioprotektif, hipolipidemik, hipoglikemik, nefroprotektif dan imunomodulator. Madu merupakan pemanis alami secara empiris sudah digunakan sebagai minuman kesehatan peningkat kekebalan. Selama ini MBJH banyak dimanfaatkan dengan mengemas MBJH dalam kapsul dan langsung dikonsumsi. Salah satu kelemahan MBJH apabila dikonsumsi langsung adalah rasanya kurang disukai dan setelah mengkonsumsi sering menimbulkan sendawa dengan bau khas

minyak atsiri yang kurang disukai. Sebagaimana MBJH, madu juga banyak dimanfaatkan secara luas dengan diminum secara langsung. Madu banyak dimanfaatkan untuk membantu pemberian obat pada anak-anak. Beberapa kelemahan di atas merupakan sumber kesulitan bagi produsen untuk memasarkan produk MBJH, herba pegagan dan kelor secara luas dan mengurangi minat masyarakat untuk mengonsumsi obat herbal tersebut, sehingga perlu inovasi agar menjadi sediaan dengan kemasan yang lebih menarik, tahan lama dan lebih diminati dari segi rasa.

Kandungan aktif MBJH, asam lemak tak jenuh maupun timokuinon terbukti dapat bertindak sebagai antioksidan. Zat aktif MBJH terbukti meningkatkan produksi enzim antioksidan endogen (GST) dan meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag. Pemberian MBJH sebelum induksi bensopiren dapat meningkatkan aktivitas respon imun dari makrofag, meningkatkan produksi enzim antioksidan endogen dan tentunya dapat menurunkan stres oksidatif sehingga menghambat pembentukan metabolit aktif bensopiren dan mempercepat ekskresi metabolit aktif bensopiren sehingga metabolit aktif bensopiren yang menekan eritropoiesis sumsum tulang dan aktivitas proliferasi limfosit berkurang. Berdasarkan latar belakang tsb maka hipotesis penelitian adalah Pemberian praperlakuan selama empat belas hari dosis 0,01 s.d. 0,2 ml/kgbb MBJH aman dan efektif sebagai kemopreventif antikarsinogenesis ca paru, meningkatkan ekspresi gen P53, menurunkan ekspresi Bcl2 dan kaspase 3, menurunkan kadar malondealdehid, meningkatkan kadar glutation s transferase, meningkatkan ekspresi Nrf2, meningkatkan ekspresi AhR, meningkatkan ekspresi TLR-4, meningkatkan aktifitas fagositosis makrofag dan sekresi IFN- $\gamma$ , meningkatkan ekspresi CD4Th, meningkatkan ekspresi CD3 dan meningkatkan ekspresi Foxp3 pada tikus SD yang diinduksi bensopiren. MBJH dibuktikan

meningkatkan aktifitas p53, meningkatkan sekresi NO dan aktifitas iNOS/NOS dari endotel. Penelitian sebelumnya telah berhasil mendapatkan MBJH sebagai antihepatotoksik (Hidayati, 2012) dan imunomodulator. Pemberian MBJH dosis 0,1 s.d. 0,25 ml/kgBB bersifat antihepatotoksik pada tikus SD yang diinduksi DMBA (Hidayati, 2013). Pemberian MBJH 14 hari sebelum induksi DMBA dapat mencegah penurunan jumlah sel CD4Th maupun CD4CD25Treg (Mousa et.al, 2004; el-Aziz et.al., 2005).

Uji toksisitas adalah uji untuk mendeteksi efek toksik dari suatu zat yang menimbulkan pengaruh pada sistem biologis dan untuk memperoleh data dosis aman dan mengetahui respon dari sediaan yang diujikan. Data yang diperoleh dapat digunakan untuk memberi informasi mengenai derajat bahaya sediaan uji apabila digunakan pada manusia, sehingga dapat ditentukan dosis amannya. Uji toksisitas menggunakan hewan uji sebagai objek dengan tujuan untuk mengetahui reaksi biokimia, fisiologik dan patologik pada manusia terhadap suatu sediaan uji. Hasil uji toksisitas tidak dapat digunakan secara mutlak untuk membuktikan keamanan suatu bahan/sediaan pada manusia, namun dapat memberikan petunjuk adanya toksisitas relatif dan membantu identifikasi efek toksik bila terjadi pemaparan pada manusia. Faktor-faktor yang menentukan hasil uji toksisitas secara *in vivo* dapat dipercaya adalah: pemilihan spesies hewan uji, galur dan jumlah hewan; cara pemberian sediaan uji; pemilihan dosis uji; efek samping sediaan uji; teknik dan prosedur pengujian termasuk cara penanganan hewan selama percobaan (BPOM, 2014). Prinsip uji toksisitas merupakan pengujian terhadap komponen bioaktif yang dapat memberikan efek toksik apabila diberikan dengan dosis tinggi dan apabila diberikan dengan dosis rendah serta tidak toksik maka akan menjadi obat. Zat atau senyawa asing yang ada di lingkungan dapat terserap kedalam tubuh secara

difusi dan langsung akan mempengaruhi keseimbangan tubuh. Uji toksisitas digunakan dengan tujuan mengetahui pengaruh racun yang dihasilkan oleh dosis tunggal dari suatu campuran zat kimia pada hewan coba sebagai uji pra skrining senyawa bioaktif (Fadli, 2015).

Uji toksisitas subkronik merupakan suatu pengujian untuk mendeteksi efek toksik yang muncul setelah pemberian dosis berulang yang diberikan secara oral pada hewan uji (OECD, 2008). Uji toksisitas subkronik pada sediaan X ini dilakukan secara oral. Uji toksisitas subkronik oral adalah suatu uji untuk mendeteksi efek toksik yang muncul setelah pemberian sediaan uji dengan dosis berulang yang diberikan secara oral pada hewan uji selama sebagian umur hewan, tetapi tidak lebih dari 10% seluruh umur hewan. Prinsip dari uji toksisitas subkronis oral adalah sediaan uji dalam beberapa tingkat dosis diberikan setiap hari pada beberapa kelompok hewan uji dengan satu dosis per kelompok selama 28 hari atau 90 hari, bila diperlukan ditambahkan kelompok satelit untuk melihat adanya efek tertunda atau efek yang bersifat reversibel. Selama waktu pemberian sediaan uji, hewan harus diamati setiap hari untuk menentukan adanya toksisitas (BPOM, 2014). Tujuan uji toksisitas subkronis oral adalah untuk memperoleh informasi adanya efek toksik zat yang tidak terdeteksi pada uji toksisitas akut; informasi kemungkinan adanya efek toksik setelah pemaparan sediaan uji secara berulang dalam jangka waktu tertentu; informasi dosis yang tidak menimbulkan efek toksik dan mempelajari adanya efek kumulatif dan efek reversibilitas zat tersebut (BPOM, 2014). Hasil uji ketoksikan subkronik akan memberikan informasi yang bermanfaat tentang efek utama senyawa uji dan organ sasaran yang dipengaruhinya. Selain itu, untuk memperoleh informasi tentang perkembangan efek toksik yang lambat berkaitan dengan dosis yang tidak teramati pada uji ketoksikan akut. Tak hanya itu, uji toksisitas

subkronik juga untuk mengetahui kekerabatan antar kadar senyawa pada darah dan jaringan terhadap perkembangan luka toksik dan keterbalikan efek toksik. (Donatus, 2001). Namun demikian sampai saat ini sediaan MMPK belum diuji tingkat keamanan akut dan sub kronik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat keamanan sediaan MMPK terhadap hemogram dan fungsi hati pada pemberian hingga 28 hari pada tikus SD.

## **B. Rumusan Masalah Penelitian**

Rincian rumusan permasalahan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bagaimana tingkat keamanan sediaan sirup MMPK pada uji ketoksikan akut?
2. Bagaimana tingkat keamanan sediaan sirup MMPK pada uji ketoksikan sub kronik?
3. Berapakah rentang dosis aman berdasarkan hasil ketoksikan akut dan sub kronik sediaan sirup MMPK?

## **C. Tujuan Penelitian**

Rincian tujuan khusus dalam penelitian tahun ke-2 ini adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui tingkat keamanan sediaan sirup MMPK hasil uji ketoksikan akut
2. Mengetahui tingkat keamanan sediaan sirup MMPK hasil uji ketoksikan sub kronik pada tikus SD
3. Mengetahui kisaran dosis aman sediaan sirup MMPK pada hewan uji tikus SD

# **BAB II**

## **METODE PENELITIAN**

### **A. Uji ketoksikan akut dan sub kronik sediaan Uji**

#### **2.1.1. Uji Ketoksikan akut sediaan IS-MMPK**

Tingkat kemanan diuji dengan metode uji ketoksikan akut untuk menentukan LD50 dan dilanjutkan dengan uji ketoksikan sub kronik selama 28 hari untuk mengetahui dosis aman. Uji ketoksikan akut dan subkronik ini menggunakan dosis terendah 5 ml/hari utk orang dewasa, dimana dosis tersebut setara dengan 0.09 ml/kgbb pada tikus, kemudian diikuti dengan 0.45 ml/kgbb (25 ml/hari orang dewasa) dan 2.25 ml/kgbb (125 ml/hari orang dewasa). Uji ketoksikan akut dan sub kronik dilakukan pada tikus SD.

#### **2.1.2. Alat, bahan dan tempat penelitian**

##### **2.1.2.1. Hewan Percobaan dan Pembagian kelompok**

Sesuai dengan anjuran dari badan POM RI, hewan percobaan yang digunakan adalah tikus putih galur Sprague dawley jantan berumur 8 – 12 minggu dengan berat rata-rata antara 120-150 g yang diperoleh dari Unit Pengadaan Hewan Percobaan (UPHP). Jumlah hewan coba yang digunakan sebanyak 50 ekor terbagi dalam 5 kelompok, masing-masing kelompok sebanyak 10 ekor, masing-masing kelompok terdiri dari lima ekor tikus jantan dan lima ekor tikus betina. Kelompok satu sebagai kontrol normal,

kelompok dua sampai empat sebagai kelompok perlakuan dengan tiga variasi dosis pemberian. Kelompok lima sebagai kelompok control recovery. Kelompok perlakuan dosis tertinggi yaitu 2.25 ml/kgbb sebagai kelompok pengujian ketoksikan akut. Sebelumnya hewan diaklimatisasi pada ruang dan kandang percobaan serta dikelompokkan berdasarkan perlakuan yang akan diberikan. Pakan dan minum diberikan secara ad libitum.

### **2.1.2.2. Bahan Uji**

Bahan uji adalah sediaan sirup MMPK. Sediaan sirup MMPK terdiri atas madu, minyak biji jinten hitam, ekstrak pegagan dan ekstrak kelor dengan komposisi tertentu. Dosis anjuran untuk penggunaan pada orang dewasa adalah 5ml-10ml/hari. Dosis anjuran penggunaan sirup MMPK didasarkan pada kandungan minyak biji jinten hitam pada sirup tersebut yaitu 30% dari sirup (1.5 ml/5 ml).

### **2.1.2.3. Peralatan dan Bahan**

Peralatan untuk uji ketoksikan akut serta peralatan analisis untuk pengujian hematologi, kimia darah, patologi dan biomolekuler. Alat yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah perangkat alat pengukur berat (timbangan hewan, timbangan digital Agis (skala 0–2.000 gram) dengan ketelitian 0,01 gram), peralatan adaptasi hewan coba (kandang tikus, tempat minum tikus, feeding tube FR-5), peralatan pemberian sirup MMPK secara oral (suntik oral 5 mL dengan jarum ukuran 18 gauge, botol untuk menyimpan dosis), mikro pipet/pipet Eppendorf, pipet, peralatan pengambilan cairan peritoneal (peralatan bedah minor, erlenmeyer 500 mL, spuit injeksi 1 mL, 3 mL, 5 mL, dan 10 mL), cover glass dan object glass, minyak imersi, sentrifugator 2.500 rpm), LCD notebook, dan peralatan dokumentasi, yaitu kamera digital.

### 2.1.3. Tahapan Penelitian Uji Ketoksikan akut

#### 2.1.3.1. Pembagian hewan uji dalam kelompok dan Prosedur Pemberian sediaan Uji

Hewan uji dipilih sesuai dengan kriteria inklusi yang telah ditetapkan berdasarkan kesesuaian umur, jenis kelamin, berat badan, sehat dan galur. Setelah dikarantina selama satu minggu kemudian hewan uji disiapkan untuk percobaan. Sebanyak 50 tikus SD jantan dan betina, berumur 8 minggu dengan berat badan antara 120-150 gram dibagi menjadi 5 kelompok secara acak, masing-masing kelompok terdiri dari 10 ekor (5 jantan dan 5 betina).

Tabel 1 menunjukkan pembagian kelompok hewan uji ke dalam empat kelompok pada uji ketoksikan akut.

Kelompok	N	Minggu ke	
		1	2
Kelompok normal	5	X	X ●
5 ml/hari BB dewasa (0.09ml/kgbb)	5	V X	V X ●
25 ml/hari BB dewasa (0.45 ml/kgbb)	5	V X	VX ●
125 ml/hari BB dewasa (2.25 ml/kgbb)	5	V X	VX ●

Keterangan :

- V : pemberian sediaan MMPK 3 variasi dosis dan pengamatan kondisi klinis, dan kejadian kematian atau morbiditas hewan uji.
- X : Pengamatan kondisi klinis hewan uji
- Pengambilan sampel darah
- Z : pengorbanan hewan uji

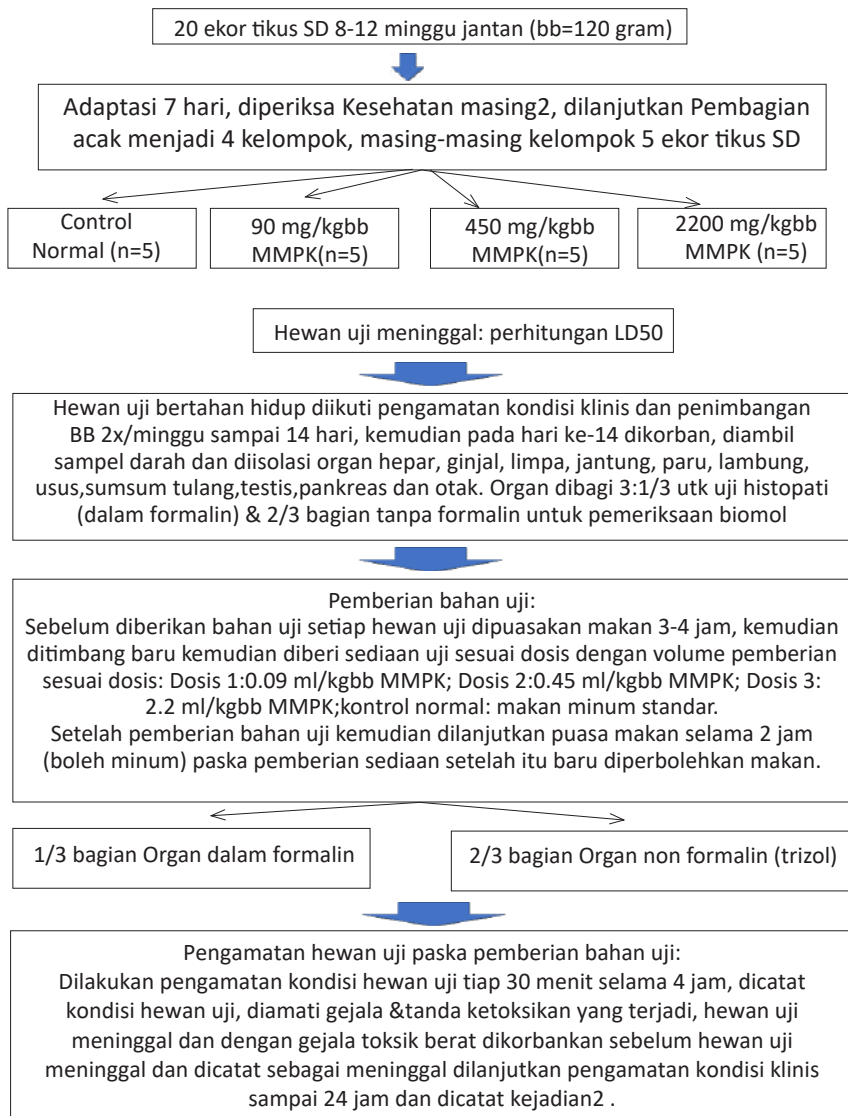


Penentuan nilai LD50 ini dengan memakai metode yang dianjurkan oleh Badan POM RI dimana bahan uji diberikan dalam tiga peringkat dosis, satu kelompok control normal. Sebelum diberikan perlakuan, setiap kelompok perlakuan (kelompok 2-4,) yang terdiri atas 5 ekor tikus putih strain SD dipuasakan (tidak diberikan makan) terlebih dahulu selama 3–4 jam dengan tetap diberikan minum (ad libitum). Setelah dipuasakan hewan uji ditimbang dan kemudian masing – masing hewan uji diberikan sirup MMPK sesuai dosis secara oral. Volume administrasi obat (VAO) dihitung sesuai dengan bobot tikus putih strain SD, volume dosis tunggal yang diberikan kepada tikus putih strain. SD tidak lebih dari 2 mL/220 mg. satu kelompok lainnya digunakan sebagai control normal. Untuk tikus putih strain SD kontrol normal mendapatkan minum standar. Ketika sampel uji telah diberikan, tikus putih strain SD tidak diberikan makan (tetap diberikan minum) selama 1–2 jam, dan kemudian tikus putih strain SD diberikan makan kembali secara ad libitum. Tikus putih strain SD diamati setiap 30 menit selama 4 jam pertama untuk pengamatan gejala ketoksikan dan kondisi klinis hewan uji dan selanjutnya diikuti sampai 24 jam. Pada pengamatan hari kedua sampai ke-14 meliputi pengamatan kondisi umum, tampilan, kondisi klinis, berat badan dan gejala ketoksikan berdasarkan system organ.

Pada hari ke-14 hewan uji yang masih bertahan hidup diambil sampel darah serta dikorbankan untuk pengambilan sampel organ. Sampel darah yang diperoleh dibagi tiga yaitu 1/3 bagian untuk pemeriksaan darah rutin dan kimia darah (5 ml), 1/3 bagian untuk pemeriksaan flowcytometry (5 ml) dan 1/3 bagian untuk pemeriksaan biomolekuler lainnya (5 ml).

Daftar organ yang diisolasi dari hewan uji meliputi hepar, ginjal, lambung, usus, pancreas, jantung, paru, limpa, sumsum tulang, testis dan otak. Organ hasil isolasi dibagi menjadi tiga bagian, 1/3

bagian dimasukkan dalam pot berformalin untuk kemudian dibuat sediaan histopatologi dan pemeriksaan histopatologi, 2/3 yang lain dimasukkan dalam potio tanpa formalin, namun potio dengan pelarut trizol untuk kemudian dilakukan isolasi DNA/RNA utk pemeriksaan selanjutnya. Bagan alir uji ketoksikan akut adalah ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Bagan alir proses pengujian ketoksikan akut oral sediaan MMPK

### **2.1.3.2. Pengamatan hasil uji ketoksikan akut dan Penetapan LD50**

Hewan uji diamati tampilan, kondisi klinis, aktifitas dan ketahanan hidup selama 24 jam. Kesehatan hewan uji ditetapkan oleh laboran yang sudah berpengalaman. Tanda-tanda toksisitas yang diamati meliputi, kulit dan bulu, mata, letargi (kelesuan), konvulsi (kejang), tremor (gemetar), diare, dan kematian. Hewan uji yang mengalami gejala ketoksikan selama periode pengamatan uji ketoksikan akut maka segera dikorbankan dan dihitung sebagai mengalami kematian. Kematian hewan uji masing-masing kelompok dosis dicatat dan kemudian dipakai sebagai dasar perhitungan LD50. Data jumlah hewan coba yang mati dianalisis dengan analisis probit untuk menentukan nilai LD50 yang selanjutnya dipakai untuk mengevaluasi potensi toksisitas akut MMPK mengikuti kriteria OECD (POM RI, 2014).

### **2.1.3.3. Pemeriksaan hematologi, kimia darah dan histopatologi**

Pada hari ke-14 dilakukan pengambilan sampel darah untuk pemantauan kondisi laboratorium hewan uji. Sampel darah yang diperoleh segera dibagi menjadi 3 bagian, satu untuk analisis hematologi (disimpan dalam tabung EDTA), satu untuk analisis koagulasi (dalam tabung sitrat) dan satu untuk biokimia serum.

#### **1. Parameter biokimia darah dan fisiologi organ vital**

Semua analisis sampel darah, dengan hasil yang dilaporkan sebagai mean  $\pm$  SD, dilakukan di Unit Laboratorium, Rumah Sakit Srinagarind, Fakultas Kedokteran, Universitas Khon Kaen, Thailand. Penganalisis Hematologi Otomatis Sysmex Xs-800i1000i (Sysmex Corporation, Kobe, Jepang) menyediakan parameter hematologi.

Sebuah Cobas 8000 Chemistry Autoanalyzer (Roche Diagnostics International Ltd., Skotlandia) digunakan untuk menentukan parameter biokimia serum, di antaranya adalah kadar glukosa, aktivitas enzim fungsi hati dan profil lipid.

Darah untuk pemeriksaan biokimiawi darah, didiamkan selama 15 menit, kemudian dipusingkan dengan sentrifuge kecepatan 4000 rpm selama 10 menit dan diambil supernatannya (serum). Serum yang diperoleh digunakan untuk penetapan kadar SGPT, SGOT, ureum dan kreatinin. Monoreagen (Reagen Mix) untuk pemeriksaan biokimiawi darah disiapkan dengan mencampurkan 4 bagian reagen 1 dan 1 bagian reagen 2 (Zaher et al., 2008).

Prinsip Kerja pemeriksaan enzim hepar SGPT dan SGOT adalah Alanin aminotransferase mengkatalis transfer grup amino dari L-alanine ke 2-oxoglutarate menyebabkan pembentukan piruvat dan glutamat. Kemudian piruvat ini mengalami reduksi bersama dengan oksidasi NADH menjadi NAD dalam proses katalisis oleh enzim Lactate dehidrogenase (LDH). Oksidasi NADH menyebabkan penurunan absorbansi pada 340 nm dan kecepatan perubahan absorbansi secara langsung berbanding lurus dengan aktivitas ALT. Prinsip Kerjanya adalah Aspartate aminotransferase mengkatalis transfer grup amino dari L-aspartat ke 2-oksoglutarat menyebabkan pembentukan oksaloasetat dan glutamat. Kemudian oksaloasetat ini mengalami reduksi bersama dengan oksidasi NADH menjadi NAD dalam proses katalisis oleh enzim Malate dehidrogenase (MDH). Oksidasi NADH menyebabkan penurunan absorbansi pada 340 nm dan kecepatan perubahan absorbansi secara langsung berbanding lurus dengan aktivitas AST. Laktat dehidrogenase yang terdapat di dalam reagen berfungsi untuk mencegah gangguan dari piruvat endogen yang secara normal terdapat dalam sampel serum pada konsentrasi rendah (Zaher et al., 2008; Akrom et al., 2007).

Pengukuran kadar kreatinin dan ureum serum dilakukan di LPPT unit 1 Universitas Gajah Mada dengan menggunakan cara Jaffe untuk kreatinin dan metode Enzimatis UV Test "Urease-GLDH" untuk kadar ureum. Sampel yang digunakan berupa serum tikus putih jantan galur SD diambil darahnya melalui sinus orbitalis sebanyak  $\pm 1,5$  ml. Darah ditampung ke dalam Eppendorf, didiamkan selama 15 menit, kemudian dipusingkan dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit dan diambil supernatannya (serum) (Tasminatun, 2005; Singletary et al., 2003).

## 2. Pengumpulan sampel dan studi histopatologi

Pada hari ke-14 setelah pengambilan darah dilanjutkan dengan pengorbanan hewan uji. Hewan uji dibius menggunakan isoflurane inhalasi dan di-eutanasia dengan tusukan jantung. Organ dalam termasuk hati, paru-paru, ginjal, jantung, limpa, pankreas, lambung, usus dan testis dikumpulkan dan masing-masing dibagi tiga bagian. Satu bagian untuk pemeriksaan histopatologi dan untuk hal tsb segera difiksasi dalam formalin buffer 10%. Dua bagian lainnya disimpan pada potio tanpa formalin untuk pemeriksaan PCR.

Untuk pemeriksaan histopatologi jaringan diproses menggunakan Automatic Tissue Processor (Hestion, Inggris) dan disematkan dengan parafin menggunakan prosesor jaringan (Bio-Optica, Italia). Jaringan yang tertanam parafin dipotong menggunakan mikrotom Microm HM 315 (Thermo Fisher Scientific, USA) dan diwarnai dengan hematoxylin dan eosin (H&E). Slide diamati di bawah mikroskop cahaya. Kemudian dilakukan pemeriksaan patologi dan imunohistopatologi oleh ahli patologi.

#### **2.1.4. Analisis data**

Analisis hasil penelitian secara statistik digunakan Shapiro-Wilk untuk mengetahui normalitas distribusi data. Apabila data terdistribusi normal dan variansi terdistribusi homogen maka dilanjutkan uji dengan ANOVA (One Analysis of Variance). Hasil data yang memiliki sinifikasi kurang dari 0,05 pada uji ANOVA dilanjutkan uji Post-Hoc LSD. Data yang tidak berdistribusi normal diuji dengan statistik non parametrik Kruskal-Wallis dan dilanjut dengan uji Mann-Whitney. Pengujian secara statistik menggunakan SPSS 16.0 (Statistic Product and Service Solution).

### **B. Uji Ketoksikan Sub kronik sediaan MMPK**

#### **2.2.1.Desain uji dan pembagian kelompok**

Desain uji ketoksikan subrkonik menggunakan desain eksperimental laboratorium in vivo pada tikus SD dengan tiga peringkat dosis. Pengujian ketoksikan subkronik menggunakan pedoman dari BPOM RI (2014) dan panduan dari OECD no 407 (2008) pengujian dosis berulang per oral selama 28 hari.

#### **2.2.2.Bahan, alat dan hewan uji**

Bahan uji adalah sediaan sirup MMPK. Bahan kimia yang digunakan meliputi Heparin (Inviclot®), CMC (foodgrade), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (Merck), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck), formaldehid (Merck), reagen kit untuk analisis biokimia darah ASAT, ALAT, Gama-GT, Urea, Kreatinin, Bilirubin total (Diasys®), dan vacutainer EDTA 3 mL (Vaculab®).Alat yang digunakan meliputi ruangan dan kandang, alat penimbang BB, alat pemeriksaan kondisi klinis dan gejala ketoksikan, alat gelas, alat anastesi, alat bedah dan perlengkapan pemeriksaan darah, kimia darah dan histopatologis. Alat penelitian

meliputi kandang individual hewan tikus (Rital®), timbangan hewan (Kern®), spektrofotometer UV-Vis (Thermo®), mikrosentrifus (mikro22 Hettich zentrifuge®), dan mikropipet (Ependrof), serta perlengkapan berupa tabung plastik sekali pakai 1,5 mL (Axigen). Hewan uji yang digunakan adalah tikus SD berumur 8-12 minggu (BB=120 gr), sejumlah 50 ekor dengan proporsi jenis kelamin sebanding jantan dan betina yaitu 50% masing-masing (1:1). Hewan uji sebelum digunakan dilakukan adaptasi selama tujuh hari. Sebelum dilakukan pengujiam seluruh hewan uji dilakukan pemeriksaan Kesehatan.

### **2.2.3. Pembagian kelompok dan Pemberian sediaan uji**

Hewan uji secara acak dibagi dalam 5 kelompok (per kelompok 10 ekor, seimbang jenis kelaminnya), yaitu kelompok normal, tiga kelompok perlakuan dan kelompok satelit (BPOM RI, 2014). Pada uji toksisitas subkronis oral ini sediaan uji diberikan dalam tiga peringkat dosis selama 28 hari dan ditambahkan kelompok satelit untuk melihat adanya efek tertunda atau efek yang bersifat reversibel. Tiga dosis pemberian bahan uji adalah 90mg/kgbb, 450 mg/kgbb dan 2200 mg/kgbb sirup MMPK. Kelompok control normal mendapatkan makan minum standar. Kelompok satelit mendapatkan 2200 mg/kgbb sirup MMPK.

Tabel 2 menunjukkan pembagian kelompok hewan uji ke dalam lima kelompok uji subkronik.

Minggu/ Kelompok	1	2 (14)	3	4(28)	5	7 (42)
Kelompok normal	X	X ●	X	●	X Z	
5 ml/hari BB dewasa (0.09ml/ kgbb)	V X	V X ●	VX	VX ●	X Z	
25 ml/hari BB dewasa (0.45 ml/ kgbb)	V X	VX ●	VX	VX ●	X Z	
125 ml/hari BB dewasa (2.25 ml/ kgbb)	V X	VX ●	VX	VX ●	X Z	
Satelit (reversibili- tas dosis 125 ml/ hari bb dewasa (=2.25 ml/kg bb)	V X	VX ●	VX	VX ●	X	X ●

Keterangan :

- V : pemberian sediaan MMPK 3 variasi dosis dan pengamatan
- : kondisi klinis, dan kejadian kematian atau morbiditas hewan uji.
- X : Pengamatan kondisi klinis hewan uji
- :
- Z : pengorbanan hewan uji

Dua kelompok lainnya digunakan sebagai kontrol normal dan kontrol satelit. Hewan diberi dosis dengan zat uji setiap hari 7 hari setiap minggu selama 28 hari. Ketika zat uji diberikan dengan gavage, ini harus dilakukan dalam dosis tunggal pada hewan dengan menggunakan selang lambung atau kanula intubasi yang sesuai. Volume maksimum cairan yang dapat diberikan pada satu waktu tergantung pada ukuran hewan uji. Volume tidak boleh melebihi 1



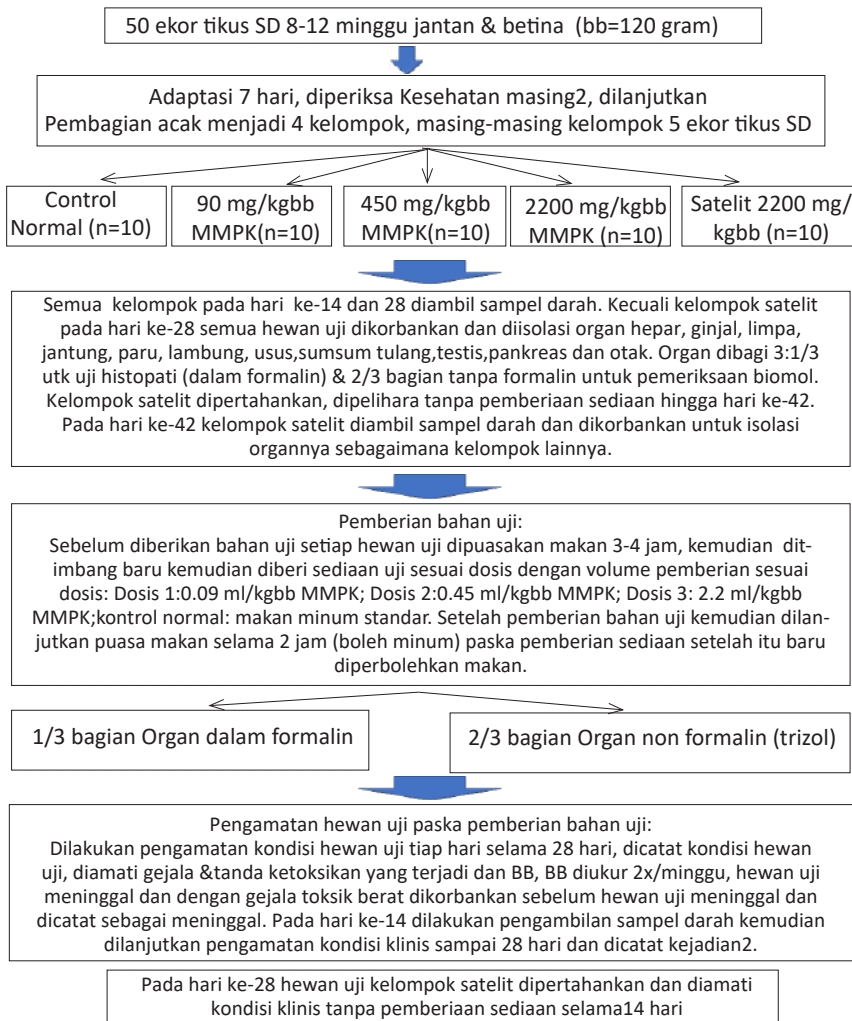
ml/100 g berat badan kecuali dalam kasus larutan berair (sirup) di mana 2 ml/100 g berat badan dapat digunakan. Bagan alir prosedur pengujian subkronik sediaan MMPK disajikan pada Gambar 2. Pengambilan sampel darah dilakukan pada hari ke-14 dan hari ke-28 untuk semua kelompok. Sampel darah dibagi 3 bagian masing-masing 5 ml. Pengambilan organ dilakukan pada hari ke-28 untuk empat kelompok selain kelompok satelit. Organ yang diisolasi kemudian dibagi menjadi tiga bagian, 1/3 dimasukkan dalam formalin dan dua bagian yang lain tanpa formalin (trizol). Organ dalam yang diambil sebagaimana pada uji ketoksikan akut meliputi hepar, ginjal, lambung, usus, jantung, paru,,limpa, pancreas, sumsum tulang, testis dan otak.

#### **2.2.4. Pengamatan gejala klinis, morbiditas dan kematian selama pengujian**

Selama waktu pemberian sediaan uji, hewan uji diamati setiap hari untuk menentukan adanya toksisitas. Hewan yang mati selama periode pemberian sediaan uji, bila belum melewati periode rigor mortis (kaku) segera dinekropsi, dan organ serta jaringan diamati secara makropatologi dan histopatologi. Pada akhir periode pemberian sediaan uji, semua hewan yang masih hidup dinekropsi selanjutnya dilakukan pengamatan secara makropatologi pada setiap organ dan jaringan. Selain itu juga dilakukan pemeriksaan hematologi, biokimia klinis dan histopatologi.

Hewan uji yang masih bertahan hidup dilanjutkan pemberian sediaan MMPK sampai hari ke-28. Pengamatan kondisi klinis hewan uji diikuti sampai hari ke-28. Pengamatan kondisi klinis yang diamati meliputi: kondisi klinis umum (perubahan pada kulit, bulu, mata, sekresi, ekskresi, cara jalan, tingkah laku aneh), terkait gangguan fungsi syaraf (kejang), gangguan gastrointestinal (diare)

dan gangguan hematologi (perdarahan spontan). Pengamatan terhadap perubahan berat badan hewan uji dilakukan 2x/minggu. Kecuali kelompok satelit, pada hari ke-28 semua hewan uji dikorbankan, diambil sampel darah dan jaringan untuk dilakukan pemeriksaan hematologi, kimia darah dan histopatologi. Kelompok satelit pengamatan kondisi klinis dilanjutkan hingga 14 hari pasca perlakuan, kemudian pada hari ke-14 pasca perlakuan dilakukan pengorbanan dan diambil sampel darah dan organ serta jaringan.



Gambar 2. Bagan alir proses pengujian ketoksikan subkronik oral sediaan MMPK

### **2.2.1. Pengamatan kondisi umum**

Pemeriksaan manifestasi klinik utama dilakukan terhadap berat badan, ketahanan hidup serta tanda-tanda toksisitas (kulit dan bulu, mata, letargi (kelesuan), konvulsi (kejang), tremor (gemetar), diare, dan kematian. Penimbangan berat badan tikus dilakukan di LPPT UGM Yogyakarta dengan menggunakan penimbang berat badan yang sesuai. Skala ukur yang digunakan adalah skala rasio. Hewan uji juga diamati manifestasi klinis dan kemampuan bertahan hidup. Kemampuan bertahan hidup dinyatakan dalam persentase kehidupan hewan uji (Meiyanto et al., 2007; Akrom et al., 2008).

### **2.2.2. Pengumpulan sampel darah dan pemeriksaan profile hemogram**

Pada hari ke-14 dan ke-28 dilakukan pengambilan sampel darah pada semua kelompok. Sampel darah yang diperoleh segera dibagi menjadi 3 bagian, satu untuk analisis hematologi (disimpan dalam tabung EDTA), satu untuk analisis koagulasi (dalam tabung sitrat) dan satu untuk biokimia serum. Pada kelompok satelit dilakukan pengambilan sampel darah ke-3 yaitu pada hari ke-42.

#### **2.2.2. Parameter biokimia darah dan fisiologi organ vital**

Semua analisis sampel darah, dengan hasil yang dilaporkan sebagai mean  $\pm$  SD, dilakukan di Unit Laboratorium, Rumah Sakit Srinagarind, Fakultas Kedokteran, Universitas Khon Kaen, Thailand. Penganalisis Hematologi Otomatis Sysmex Xs-800i1000i (Sysmex Corporation, Kobe, Jepang) menyediakan parameter hematologi. Sebuah Cobas 8000 Chemistry Autoanalyzer (Roche Diagnostics International Ltd., Skotlandia) digunakan untuk menentukan parameter biokimia serum, di antaranya adalah kadar glukosa, aktivitas enzim fungsi hati dan profil lipid.

Darah untuk pemeriksaan biokimiawi darah, didiamkan selama 15 menit, kemudian dipusingkan dengan sentrifuge kecepatan 4000 rpm selama 10 menit dan diambil supernatannya (serum). Serum yang diperoleh digunakan untuk penetapan kadar SGPT, SGOT, ureum dan kreatinin. Monoreagen (Reagen Mix) untuk pemeriksaan biokimiawi darah disiapkan dengan mencampurkan 4 bagian reagen 1 dan 1 bagian reagen 2 (Zaher et al., 2008).

Prinsip Kerja pemeriksaan enzim hepar SGPT dan SGOT adalah Alanin aminotransferase mengkatalis transfer grup amino dari L-alanine ke 2-oxoglutarate menyebabkan pembentukan piruvat dan glutamat. Kemudian piruvat ini mengalami reduksi bersama dengan oksidasi NADH menjadi NAD dalam proses katalisis oleh enzim Lactate dehidrogenase (LDH). Oksidasi NADH menyebabkan penurunan absorbansi pada 340 nm dan kecepatan perubahan absorbansi secara langsung berbanding lurus dengan aktivitas ALT. Prinsip Kerjanya adalah Aspartate aminotransferase mengkatalis transfer grup amino dari L-aspartat ke 2-oksoglutarat menyebabkan pembentukan oksaloasetat dan glutamat. Kemudian oksaloasetat ini mengalami reduksi bersama dengan oksidasi NADH menjadi NAD dalam proses katalisis oleh enzim Malate dehidrogenase (MDH). Oksidasi NADH menyebabkan penurunan absorbansi pada 340 nm dan kecepatan perubahan absorbansi secara langsung berbanding lurus dengan aktivitas AST. Laktat dehidrogenase yang terdapat di dalam reagen berfungsi untuk mencegah gangguan dari piruvat endogen yang secara normal terdapat dalam sampel serum pada konsentrasi rendah (Zaher et al., 2008; Akrom et al., 2007).

Pengukuran kadar kreatinin dan ureum serum dilakukan di LPPT unit 1 Universitas Gajah Mada dengan menggunakan cara Jaffe untuk kreatinin dan metode Enzimatis UV Test "Urease-GLDH" untuk

kadar ureum. Sampel yang digunakan berupa serum tikus putih jantan galur SD diambil darahnya melalui sinus orbitalis sebanyak  $\pm 1,5$  ml. Darah ditampung ke dalam Eppendorf, didiamkan selama 15 menit, kemudian dipusingkan dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit dan diambil supernatannya (serum) (Tasminatun, 2005; Singletary et al., 2003).

### **2.2.2. Pengumpulan sampel dan studi histopatologi**

Semua kelompok kecuali kelompok satelit, pada hari ke-28 setelah pengambilan darah dilanjutkan dengan pengorbanan hewan uji. Hewan uji dibius menggunakan isoflurane inhalasi dan dieutanasia dengan tusukan jantung. Organ dalam termasuk hati, paru-paru, ginjal, jantung, limpa, pankreas, lambung, usus dan ovarium atau testis dikumpulkan dan masing-masing dibagi tiga bagian. Satu bagian untuk pemeriksaan histopatologi dan untuk hal tsb segera difiksasi dalam formalin buffer 10%. Dua bagian lainnya disimpan pada potio tanpa formalin untuk pemeriksaan PCR. Kelompok satelit dipertahankan hidup dan dipelihara dengan makan minum standar hingga hari ke-42. Pada hari ke-42 kelompok satelit diambil sampel darah dan kemudian dikorbankan untuk diisolasi organnya sebagaimana kelompok lainnya.

Pemeriksaan histopatologi jaringan diproses menggunakan Automatic Tissue Processor (Hestion, Inggris) dan disematkan dengan parafin menggunakan prosesor jaringan (Bio-Optica, Italia). Jaringan yang tertanam parafin dipotong menggunakan mikrotom Microm HM 315 (Thermo Fisher Scientific, USA) dan diwarnai dengan hematoxylin dan eosin (H&E). Slide diamati di bawah mikroskop cahaya. Kemudian dilakukan pemeriksaan patologi dan imunohistopatologi oleh ahli patologi.

### **2.3. Analisis data**

Analisis hasil penelitian secara statistik digunakan Shapiro-Wilk untuk mengetahui normalitas distribusi data. Apabila data terdistribusi normal dan variansi terdistribusi homogen maka dilanjutkan uji dengan ANOVA (One Analysis of Variance). Hasil data yang memiliki sinifikasi kurang dari 0,05 pada uji ANOVA dilanjutkan uji Post-Hoc LSD. Data yang tidak berdistribusi normal diuji dengan statistik non parametrik Kruskal-Wallis dan dilanjut dengan uji Mann-Whitney. Pengujian secara statistik menggunakan SPSS 16.0 (Statistic Product and Service Solution).

## BAB III

# HASIL UJI KETOKSIKAN AKUT DAN PEMBAHASAN

### A. Keadaan Hewan Uji

Hewan uji yang dipilih pada penelitian ini adalah tikus jantan galur *Sprague Dawley* sebanyak 30 ekor, berumur 6-8 minggu dengan berat badan sekitar 200-300 gram. Hewan uji yang digunakan harus dalam kondisi sehat yang bertujuan untuk memastikan efek yang muncul adalah karena pengaruh pemberian sediaan uji. Untuk mengetahui apakah hewan uji yang digunakan dalam kondisi sehat, maka perlu dilihat dari kondisi umum dan kemampuan hidup hewan uji. Pengamatan terhadap kondisi umum hewan uji meliputi rata-rata berat badan, tampilan bulu, kelincahan, dan jumlah kematian hewan uji. Pada penelitian ini dilakukan penimbangan berat badan hewan uji setiap dua kali seminggu selama penelitian berlangsung setelah aklimatisasi (adaptasi) dilakukan. Data perubahan berat badan hewan uji seringkali digunakan untuk mengevaluasi kondisi kesehatan hewan uji secara umum dan untuk mengetahui kemungkinan adanya efek toksik akibat pemberian sediaan uji.

Pengamatan secara kualitatif untuk mengetahui gejala toksik klinis meliputi kondisi fisik, bulu dan kulit, pupil mata, perubahan, kelesuan, dan bentuk feses (Utami et al., 2018). Setelah dilakukan pemberian sediaan X selama 28 hari tikus tidak mengalami gejala toksik secara kualitatif. Selain itu, berat badan tikus juga penting

untuk diamati untuk mengetahui gejala toksisitas. Penurunan berat badan pada tikus bisa dianggap sebagai gejala toksisitas (Eryanti, 2013). Penurunan berat badan dapat yang disebabkan senyawa toksik dalam sediaan uji dapat mengganggu kerja enzim pencernaan sehingga menurunkan nafsu makan yang akan berdampak pada kondisi penurunan berat badan tikus (Christianty et al., 2017). Data hasil penimbangan berat badan selama pengujian menunjukkan bahwa pemberian sediaan X pada semua dosis uji tidak menyebabkan penurunan berat badan secara berarti (berfluktuasi), namun secara umum rata-rata berat badan hewan uji mengalami peningkatan. Data rata-rata berat badan hewan uji dapat dilihat pada table 3.1.

Tabel III.1. Rata-rata berat Badan Tikus berdasarkan hari pengukuran

Hari ke-	1	4	7	10	13
<b>Kelompok kontrol normal</b>					
1	223,2	265,6	280,2	285,7	299,9
2	218,5	257	266,6	273,8	284,6
3	227,3	273,4	286,4	294,2	304
4	223,4	245,6	251,8	270,2	280,8
5	224,3	248,8	261	270,3	282,6
$\bar{x}$	223,3	258,1	269,2	278,5	290,4
<b>Dosis 1 (0,018 mL/200gBB)</b>					
1	267,1	274	286	291,9	297,3
2	257	273,3	280,5	287,5	299,8
3	261,5	277,6	283,5	286,7	297,4
4	257,4	272	279,7	284,2	295,8
5	251,1	266,8	277,8	288,1	301,3
$\bar{x}$	258,8	272,7	281,5	287,7	298,3



Dosis 2 (0,09 mL/200gBB)					
1	254,5	261,9	275,4	287,8	291,8
2	261,8	250,1	259,4	270,9	278,4
3	262,1	257,7	266,7	276,1	287,2
4	256,3	244,9	254,9	263,5	271,6
5	247	260	269,6	282,4	292,9
$\bar{x}$	256,3	254,9	265,2	276,1	284,4
Dosis 3 (0,45 mL/200gBB)					
1	238,3	271,7	279,4	289,2	292,8
2	232,3	265,5	275	285,6	291,8
3	237	264,8	274,3	281,7	290,1
4	230,4	279,8	290,7	300,2	313,4
5	238,4	272,1	285,9	297,8	307,9
$\bar{x}$	235,3	270,8	281,2	290,9	299,2
Dosis 4 (2,25 mL/200gBB)					
1	189,7	199,4	212	219,7	227
2	192,9	207	214,5	219,5	230,2
3	198,2	210,8	219,5	227,4	237,5
4	218,4	234,8	243,1	254,2	263,9
5	212,3	274,1	221,3	220,3	226,5
$\bar{x}$	202,3	225,2	222,1	228,2	237,0

Dari hasil penimbangan berat badan diketahui berat badan hewan uji termasuk dalam kondisi normal berdasarkan berat badan per umur hewan uji. Penimbangan berat badan tikus dilakukan dua kali seminggu dan sebelum diberikan perlakuan untuk mengetahui berat pra kondisi sebelum perlakuan. Berat badan tikus selama penelitian baik kontrol dan kelompok perlakuan selama 28 hari cenderung mengalami kenaikan berat badan walaupun saat penimbangan ada beberapa kelompok perlakuan yang mengalami penurunan berat

badan namun penurunan tidak terjadi secara signifikan. Tidak adanya penurunan berat badan secara signifikan disebabkan kondisi lingkungan tikus, sudah beradaptasi, pakan, dan minuman. Selain itu, pemberian sediaan X yang mengandung asam lemak dari jintan hitam (Yusuf, 2014) juga bisa dapat menyebabkan kenaikan berat badan.

## B. Kematian hewan uji

Pada pengamatan 24 jam pertama didapatkan kenyataan bahwa hewan uji tidak terdapat perubahan fisik pada penampilan baik bulu maupun kulit, gerakannya lincah dan nafsu makan tetap baik. Hal tersebut menunjukkan bahwa hewan uji dalam kondisi sehat selama dilakukan perlakuan dan tidak mengalami stress. Dari empat kelompok hewan uji tidak ditemukan adanya hewan uji yang menunjukkan adanya kelainan apalagi kematian. Berdasarkan data tersebut maka LD50 sediaan MMPK tidak dapat diidentifikasi. Berdasarkan hasil penelitian ini menunjukkan bahwa sediaan MMPK termasuk sediaan dengan tingkat ketoksikan sangat rendah-tidak toksik.

Hasil pengamatan kondisi umum hewan uji dan kemampuan hidup disajikan pada Tabel III.2.

Tabel I.2. Jumlah kematian hewan uji

Kelompok	Dosis sediaan X (mL/200gBB)	Jumlah hewan uji yang mati	Kondisi klinis
Kontrol Normal	-	0	Tidak ada kelainan
Kontrol uji dosis 1	0,018	0	tidak ada kelaianan
Kontrol uji dosis 2	0,09	0	tidak ada kelaianan
Kontrol uji dosis 3	0,45	0	tidak ada kelaianan
Kontrol uji dosis 4	2,25	0	tidak ada kelaianan

Berdasarkan tabel III.2. dapat dilihat bahwa pemberian sediaan X selama 28 hari tidak menyebabkan kematian terhadap hewan uji. Berdasarkan hasil pengujian ini dapat disimpulkan sediaan MMPK termasuk sediaan dengan tingkat ketoksikan sangat ringan/tidak toksik.

### **C. Kesimpulan Hasil Ketoksikan akut**

Data hasil penelitian menunjukkan bahwa sediaan MMPK tidak menimbulkan kematian maupun perubahan penampilan hewan uji. Sediaan MMPK memiliki ketoksikan tingkat sangat rendah atau tidak toksik.

# BAB IV

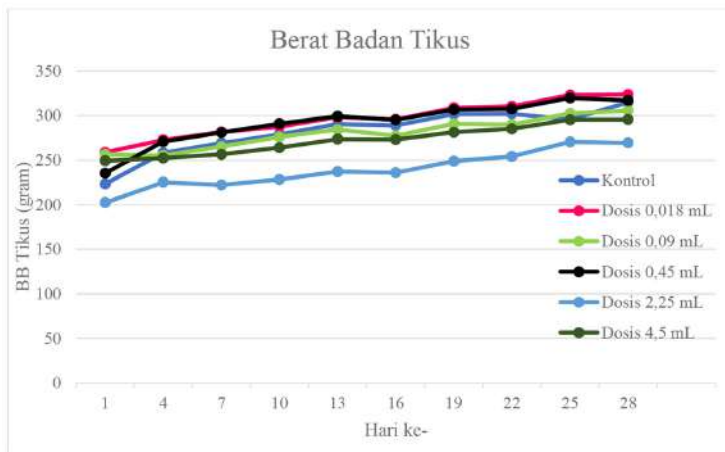
## HASIL UJI KETOKSIKAN SUBKRONIK

### A. Keadaan Hewan Uji

Hewan uji yang telah dilakukan pemberian sediaan X selama 28 hari dalam kondisi sehat secara fisik dan tidak ada jumlah tikus yang mati pada setiap kelompok perlakuan. Pengamatan secara kualitatif untuk mengetahui gejala toksik klinis meliputi kondisi fisik, bulu dan kulit, pupil mata, perubahan, kelesuan, dan bentuk feses (Utami *et al.*, 2018). Setelah dilakukan pemberian sediaan X selama 28 hari tikus tidak mengalami gejala toksik secara kualitatif. Selain itu, berat badan tikus juga penting untuk diamati untuk mengetahui gejala toksisitas. Penurunan berat badan pada tikus bisa dianggap sebagai gejala toksisitas (Eryanti, 2013). Penurunan berat badan dapat yang disebabkan senyawa toksik dalam sediaan uji dapat mengganggu kerja enzim pencernaan sehingga menurunkan nafsu makan yang akan berdampak pada kondisi penurunan berat badan tikus (Christianty *et al.*, 2017).

Penimbangan berat badan tikus dilakukan dua kali seminggu dan sebelum diberikan perlakuan untuk mengetahui berat pra kondisi sebelum perlakuan. Berat badan tikus selama penelitian baik kontrol dan kelompok perlakuan selama 28 hari cenderung mengalami kenaikan berat badan walaupun saat penimbangan ada beberapa

kelompok perlakuan yang mengalami penurunan berat badan namun penurunan tidak terjadi secara signifikan. Tidak adanya penurunan berat badan secara signifikan disebabkan kondisi lingkungan tikus, sudah beradaptasi, pakan, dan minuman. Selain itu, pemberian sediaan X yang mengandung asam lemak dari jintan hitam (Yusuf, 2014) juga bisa dapat menyebabkan kenaikan berat badan. Menurut Ali *et al.* (2015) asam lemak dapat meningkatkan berat badan tikus dengan adanya penambahan cadangan lemak di dalam tubuh yang berpengaruh terhadap berat badan. Adapun berat badan tikus selama 28 hari dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar IV.1 Berat badan tikus selama 28 hari

## B. Pengaruh pemberian MMPK terhadap Hemogram

### B.1. Pengaruh pemberian MMPK terhadap Eritrosit dan hematokrit

Penelitian tentang pengaruh pemberian sediaan X selama 28 hari ini menggunakan beberapa parameter. Parameter pada penelitian ini adalah jumlah eritrosit dan nilai hematokrit tikus jantan galur *Sprague dawley*. Sampel darah tikus dianalisis secara statistik

dengan menggunakan SPSS 22.0 untuk menentukan perbedaan antar kelompok setelah diberi perlakuan sediaan X dengan 5 tingkatan variasi dosis selama 28 hari. Data rata-rata jumlah eritrosit dan nilai hematokrit pada kelompok kontrol dan perlakuan yang diberi sediaan X diuraikan dalam bentuk tabel sebagai berikut:

Tabel IV.1. Rata-Rata Jumlah Eritrosit dan Nilai Hematokrit tikus SD setelah pemberian sediaan MMPK selama 28 hari

Kelompok	Dosis sediaan X (mL/200gBB) Mean ± SD	Jumlah Eritrosit ( $10^{12}/L$ )	Nilai Hematokrit (%)
		Mean ± SD	
Kontrol	-	7.40 ± 0.39	44.76 ± 1.69
Dosis 1	0,018 mL/200gBB	7.68 ± 0.30 <sup>a</sup>	46.72 ± 1.26 <sup>b</sup>
Dosis 2	0,09 mL/200gBB	7.40 ± 0.21 <sup>a</sup>	45.00 ± 0.97 <sup>a</sup>
Dosis 3	0,45 mL/200gBB	7.42 ± 0.33 <sup>a</sup>	45.46 ± 1.13 <sup>a</sup>
Dosis 4	2,25 mL/200gBB	7.18 ± 0.13 <sup>a</sup>	43.62 ± 1.46 <sup>a</sup>
Referensi*		6.39 – 8.01	42-29
Keterangan:	a =	tidak berbeda signifikan ( $p > 0,05$ ) terhadap kelompok kontrol	
	b =	berbeda signifikan ( $p < 0,05$ ) terhadap kelompok kontrol	
	* =	(He et al. 2017)but reference intervals have not been well established for these analytes. Reference intervals as presently defined for these analytes in Sprague-Dawley rats have not used internationally recommended statistical method nor stratified by sex. Thus, we aimed to establish sex-specific reference intervals for hematologic and biochemical parameters in Sprague-Dawley rats according to Clinical and Laboratory Standards Institute C28-A3 and American Society for Veterinary Clinical Pathology guideline. Methods Hematology and biochemistry blood samples were collected from 500 healthy Sprague-Dawley rats (250 males and 250 females	

Tabel IVIV.1. tersebut menyajikan hasil pemeriksaan rata-rata jumlah eritrosit dan nilai hematokrit dari hewan uji tikus jantan *Sprague Dawley* yang diberi perlakuan sediaan X yang mengandung minyak biji jintan hitam dan ekstrak temulawak. Hasil penelitian membuktikan bahwa rata-rata jumlah eritrosit perlakuan tidak berbeda signifikan dengan jumlah eritrosit pada kelompok kontrol ( $p>0,05$ ). Nilai hematokrit pada dosis 0,018 mL/200gBB ( $46.72 \pm 1.26$ ) lebih tinggi dari nilai hematokrit pada kelompok kontrol ( $44.76 \pm 1.69$ ) ( $p<0,05$ ). Sedangkan nilai hematokrit pada kelompok perlakuan dosis lainnya dengan nilai hematokrit pada kelompok kontrol tidak terdapat perbedaan yang signifikan ( $p>0,05$ ). Pemberian sediaan X mampu meningkatkan jumlah eritrosit dan nilai hematokrit, ditunjukkan dengan jumlah eritrosit dan nilai hematokrit perlakuan yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol, kecuali pada kelompok dosis 2,25 mL/200gBB dengan jumlah eritrosit ( $7.18 \times 10^{12}/L$ ) dan nilai hematokrit (43.62 %) lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol. Jumlah eritrosit dan nilai hematokrit pada dosis 0,018 mL/200gBB; 0,09 mL/200gBB ; 0,45 mL/200gBB ; dan 4,5 mL/200gBB lebih tinggi dari jumlah eritrosit dan nilai hematokrit pada kelompok kontrol.

Berdasarkan diagram tersebut didapatkan bahwa rata-rata eritrosit tertinggi didapatkan dari kelompok tikus dosis 0,018 mL/200gBB tikus dan paling rendah dari kelompok tikus dosis 2,25 mL/200gBB. Dari diagram didapatkan bahwa rata-rata hematokrit tertinggi didapatkan dari kelompok tikus dosis 0,018 mL/200gBB tikus dan paling rendah dari kelompok tikus dosis 2,25 mL/200gBB.

Tabel IV.2. Hasil Uji Normalitas Jumlah Eritrosit dan Nilai Hematokrit

Tests of Normality						
Shapiro-Wilk						
Kelompok	Jumlah Eritrosit			Nilai Hematokrit		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Kontrol	.920	5	.530	.924	5	.555
Dosis 0,018 mL/200gBB	.858	5	.220	.898	5	.402
Dosis 0,09 mL/200gBB	.910	5	.468	.902	5	.420
Dosis 0,45 mL/200gBB	.853	5	.203	.876	5	.291
Dosis 2,25 mL/200gBB	.902	5	.421	.846	5	.181
*. This is a lower bound of the true significance.						
a. Lilliefors Significance Correction						

Pada TabelIV.2. hasil penelitian uji toksisitas subkronik sediaan mengandung minyak biji jintan hitam (*Nigella sativa* L.) dan ekstrak temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) pada jumlah eritrosit dan nilai hematokrit tikus jantan dari masing-masing kelompok memiliki distribusi data yang normal berdasarkan uji normalitas *Saphiro Wilk* ( $p > 0,05$ ).

Tabel IV.3. Uji Homogenitas Jumlah Eritrosit dan Nilai Hematokrit

Test of Homogeneity of Variances							
Jumlah Eritrosit				Nilai Hematokrit			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.849	5	24	.529	.496	5	24	.776

Perhitungan statistik uji homogenitas didapat *Tets of Homogeneity of Variance* pada jumlah eritrosit = 0,529 ( $p > 0,05$ ) dan nilai hemaotokrit = 0,776 ( $p > 0,05$ ). Hal ini menunjukkan bahwa jumlah



eritrosit dan nilai hematokrit memiliki data dengan variasi yang sama atau homogen.

Uji *One Way ANOVA* dilakukan untuk mengetahui apakah data tersebut terdapat perbedaan bermakna pada setiap kelompok atau tidak. Pemberian sediaan mengandung minyak biji jantan hitam dan ekstrak temulawak pada tikus jantan *Sprague Dawley* tidak terdapat perbedaan bermakna terhadap jumlah eritrosit, dengan nilai signifikansi 0,183 ( $p > 0,05$ ). Sedangkan pada nilai hematokrit diperoleh nilai signifikansi 0,022 ( $p < 0,05$ ). Hal tersebut menyatakan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna pada nilai hematokrit. Maka, dilakukan uji dengan analisis *Post Hoc LSD* untuk mengetahui letak perbedaan masing-masing antar kelompok tersebut.

Tabel IV.4. Uji Post Hoc LSD Nilai Hematokrit

	Kontrol	Dosis (mL/200gBB)			
		Dosis 0,018	Dosis 0,09	Dosis 0,45	Dosis 2,25
Kontrol	-	0.023*	0.768	0.393	0.169
Dosis 0,018 (mL/200gBB)	0.023*	-	0.043*	0.130	0.001*
Dosis 0,09 (mL/200gBB)	0.768	0.043	-	0.573	0.099
Dosis 0,45 (mL/200gBB)	0.393	0.130	0.573	-	0.031*
Dosis 2,25 (mL/200gBB)	0.169	0.001*	0.009*	0.031*	-

Keterangan: \* = berbeda signifikan ( $p < 0,05$ ) terdapat perbedaan bermakna.

Berdasarkan Tabel IV.4, diketahui hasil perbandingan pada masing-masing antar kelompok. Terdapat perbedaan bermakna antar kelompok. Namun tidak menunjukkan adanya efek toksisitas subkronik pada setiap kelompok. Hal tersebut diketahui berdasarkan

Tabel IVIV.4. rata-rata nilai hematokrit pada kelompok perlakuan masih dalam rentang normal berdasarkan referensi.

Dari hasil penelitian ini diketahui bahwa tidak terdapat adanya kondisi anemia yang ditandai dengan turunnya jumlah eritrosit dan nilai hematokrit. Selain itu, tidak menunjukkan adanya polisitemia sebagai petunjuk peningkatan jumlah eritrosit dan nilai hematokrit. Hasil penelitian ini mengindikasikan pemberian sediaan X yang mengandung minyak biji jintan hitam dan ekstrak temulawak adalah aman dan tidak menyebabkan efek toksisitas subkronik pada tikus jantan *Sprague Dawley*.

Jumlah eritrosit rata-rata pada tikus jantan *Sprague Dawley* pada penelitian ini masih berada pada kisaran normal, dengan nilai eritrosit terendah  $7,18 \times 10^{12}/L$  dan tertinggi adalah  $7,68 \times 10^{12}/L$ . Demikian halnya dengan nilai hematokrit rata-rata pada penelitian ini dengan nilai hematokrit terendah adalah 43,62% dan tertinggi adalah 46,72%. Menurut (He *et al.*, 2017) but reference intervals have not been well established for these analytes. Reference intervals as presently defined for these analytes in Sprague-Dawley rats have not used internationally recommended statistical method nor stratified by sex. Thus, we aimed to establish sex-specific reference intervals for hematologic and biochemical parameters in Sprague-Dawley rats according to Clinical and Laboratory Standards Institute C28-A3 and American Society for Veterinary Clinical Pathology guideline. Methods Hematology and biochemistry blood samples were collected from 500 healthy Sprague-Dawley rats (250 males and 250 females total jumlah eritrosit tikus jantan *Sprague dawley*  $6.39 - 8.01 \times 10^{12}/L$  dan nilai hematokrit 42-49%.

Sediaan uji yang digunakan memberikan pengaruh pada jumlah eritrosit. Penurunan dan peningkatan jumlah eritrosit tidak sebanding dengan peningkatan dosis sediaan X. Jumlah eritrosit berfluktuasi

pada kisaran normal. Sehingga pemberian sediaan X tidak berefek negatif bagi eritrosit. Hal tersebut dapat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan, kandang, metode pemberian pakan, dan pemeliharaan, serta iklim dan suhu selama proses perawatan tikus (Fatimah *et al.*, 2019). Selain itu, penurunan jumlah eritrosit dapat disebabkan beberapa faktor seperti faktor volume darah, dan suhu lingkungan. Jumlah eritrosit total dapat meningkat pada suhu lingkungan rendah, sebaliknya eritrosit total dapat mengalami penurunan ketika suhu lingkungan tinggi (Wientarsih, Derthi Widhyari, and Aryanti, 2013).

Berdasarkan hasil penelitian ini, pemberian sediaan mengandung minyak biji jintan hitam dan ekstrak temulawak tidak menyebabkan efek toksisitas subkronik pada jumlah eritrosit darah tikus jantan meskipun terjadi penurunan dan peningkatan jumlah eritrosit dibandingkan dengan kelompok kontrol normal dan masih dalam rentang normal. serta berdasarkan hasil analisis statistik tidak terdapat perbedaan yang signifikan.

Jumlah eritrosit yang rendah dapat diakibatkan oleh pendarahan, kerusakan eritrosit, atau kurangnya produksi eritrosit karena kekurangan asam folat. (Fatimah *et al.*, 2019). Peningkatan jumlah eritrosit berkaitan dengan peningkatan kadar glutathion pada sel darah merah. Salah satu komponen senyawa sulfur yang berfungsi meningkatkan level glutathion sel darah merah (Pujiastuti, Lestari, and Gofur, 2017). Selain itu, faktor seperti regenerasi sel darah merah adalah pendarahan, penekanan eritropoiesis dan turunnya massa tubuh dan konsumsi pakan. Penurunan nafsu makan dapat mempengaruhi sistem hematopoiesis (pembentukan sel darah) dan menunjukkan penurunan jumlah sel darah putih, trombosit dan retikulosit (Christianty, Sidharta, and Fitria, 2017).

Eritrosit dibentuk dalam sumsum tulang. Bila jumlah sel darah merah berkurang, hormon eritropoietin yang diproduksi oleh ginjal,

akan mendorong pembentukan sel darah merah. Karena sel darah merah tidak mengandung inti sel (nucleus), maka sel tersebut tidak dapat mensintesis enzim untuk kelangsungan hidup. Kehidupan sel darah merah hanya sepanjang masih terdapatnya enzim yang masih berfungsi (untuk membawa O<sub>2</sub> dan CO<sub>2</sub>), dan biasanya hanya sekitar 4 bulan. Kecepatan penghancuran sel darah merah akan meningkat bila tubuh kekurangan vitamin C, vitamin E atau vitamin B12 (yang membantu pembentukan sel darah merah). Kehidupan eritrosit hanya berlangsung sekitar 120 hari, maka 1/120 sel eritrosit harus diganti setiap hari, yang memerlukan sekitar 20 mg zat besi (Fe) per hari (Munawaroh, 2009).

Kandungan Fe pada jintan hitam menjadi salah satu komponen yang dapat membantu peningkatan produksi testosterone yang secara tidak langsung meningkatkan produksi sel darah merah (Adam *et al.*, 2014). Selain itu, terdapat kandungan kurkumin dari ekstrak temulawak yang membantu pencegahan oksidasi hemoglobin dan lisisnya eritrosit, disebabkan adanya struktur fenolik (Fahrurrozi *et al.*, 2014).

Protein merupakan salah satu unsur dalam pembentukan eritrosit darah. Enzim protease dalam tubuh merupakan enzim ekstraseluler yang berfungsi menghidrolisis protein menjadi asam amino yang dibutuhkan tubuh. Kurangnya prekursor seperti zat besi dan asam amino yang membantu pembentukan eritrosit akan menyebabkan penurunan jumlah eritrosit. Keadaan ini dapat disebabkan oleh gangguan penyerapan atau nilai gizi yang berkurang pada pakan atau sediaan uji yang diberikan sehingga akan mempengaruhi organ yang berperan dalam produksi sel darah (Maulidina *et al.*, 2016).

Efek dari gagalnya proses eritropoiesis (pembentukan sel darah merah) mengakibatkan bentuk makrosit tidak teratur dan memiliki membran yang sangat tipis, besar, bentuknya oval berbeda dengan

bentuk normal yaitu lempeng cekung. Hal ini berpengaruh pada pengangkutan oksigen ke jaringan tubuh, bentuk makrosit yang tidak sempurna akan mudah lisis yang mengakibatkan masa hidup eritrosit bertambah pendek. (Maulidina *et al.*, 2016).

Adanya peningkatan nilai hematokrit secara bermakna pada dosis 0,018 dibandingkan dengan kontrol menunjukkan adanya dugaan bahwa dengan pemberian sediaan X dosis 0,018 mL/200gBB justru tidak menyebabkan timbulnya efek toksik. Hal tersebut didukung dengan fakta bahwa vitamin seperti vitamin C, vitamin E yang terkandung dalam minyak biji jantan hitam dapat membantu pembentukan sel darah merah (Gilani *et al.*, 2004) dan terdapat kandungan kurkumin dari temulawak yang berperan sebagai antioksidan karena kemampuannya meniadakan radikal bebas dan radikal peroksida sehingga efektif dalam menghambat oksidasi lipid (Masti *et al.*, 2020)

Nilai hematokrit yang menurun merupakan indikator dari anemi, leukemia, sirosis, kehilangan darah dan hipertiroidisme (Fatimah *et al.*, 2019). Menurunnya nilai hematokrit menandakan jumlah sel darah merah dalam tubuh menurun dikarenakan jumlah sel darah putih dalam darah sedang diproduksi banyak untuk membersihkan benda asing yang masuk ke dalam tubuh (Hidayat, Harpeni, and Wardiyanto, 2014).

Nilai hematokrit terjadi penurunan pada dosis 2,25 mL/200gBB. Meskipun terdapat perbedaan nilai hematokrit yang signifikan, tetapi semua kelompok perlakuan menunjukkan nilai rata-rata dalam rentang referensi. Penurunan dan kenaikan nilai hematokrit dari semua perlakuan masih dalam batas normal. Berdasarkan hal tersebut, pemberian sediaan tersebut dianggap tidak dapat menyebabkan efek toksik pada nilai hematokrit tikus jantan galur *Sprague Dawley*.

Apabila terjadi penyimpangan dari nilai hematokrit berpengaruh penting terhadap kemampuan darah untuk membawa oksigen ( $O_2$ ). Nilai hematokrit secara umum juga menjadi indikator penentuan kemampuan darah dalam mengangkut oksigen ( $O_2$ ) yang biasa dikenal dengan istilah *Oxygen Carrying Capacity*. Nilai hematokrit dalam tikus dapat mengalami penurunan dan peningkatan yang disebabkan oleh kondisi tubuh tikus itu sendiri atau yang biasa disebut homeostatis (Allo, 2018).

Nilai hematokrit tergantung pada jumlah eritrosit, ukuran eritrosit serta volume darah. Peningkatan nilai hematokrit mengindikasikan adanya dehidrasi, pendarahan atau edema akibat dari adanya pengeluaran cairan dari pembuluh darah. Sedangkan penurunan nilai hematokrit dapat dijumpai pada kondisi anemia akibat kekurangan sel darah merah (Wientarsih *et al.*, 2013). Turunnya presentase hematokrit dapat dikaitkan dengan turunnya jumlah eritrosit pada hari yang sama. Serta dapat juga disebabkan karena kehilangan darah akibat pengambilan darah secara berulang (Christianty *et al.*, 2017). Selain itu, nilai hematokrit akan menurun saat terjadinya hemodelusi, karena penurunan kadar seluler darah atau peningkatan plasma darah, seperti pada anemia (Hidayat, Yaswir, and Murni, 2017).

Nilai hematokrit biasanya dianggap sama manfaatnya dengan hitungan eritrosit total. Secara normal, jumlah eritrosit berkorelasi positif dengan nilai hematokrit. Besarnya nilai hematokrit, dipengaruhi oleh bangsa dan jenis ternak, umur dan fase produksi, jenis kelamin ternak, penyakit, serta iklim setempat. Naik turunnya nilai hematokrit tergantung pada volume sel-sel darah yang dibandingkan dengan volume darah keseluruhan (Rosita, Mushawwir, and Latipudin, 2015). Berdasarkan hasil ini tampak bahwa nilai hematokrit dengan jumlah eritrosit memiliki keterkaitan. Semakin besar jumlah eritrosit, maka semakin besar pula nilai hematokrit dalam darah. Begitupun

sebaliknya, penurunan nilai hematokrit dapat disebabkan oleh kerusakan eritrosit, penurunan produksi eritrosit atau dapat juga dipengaruhi oleh jumlah dan ukuran eritrosit. Nilai hematokrit tergantung pada jumlah eritrosit, karena eritrosit merupakan massa sel terbesar dalam darah (Rosita *et al.*, 2015). Jumlah eritrosit dan nilai hematokrit berjalan sejajar satu sama lain apabila terjadi perubahan (Allo, 2018).

Eritropoiesis (pembentukan sel darah merah) membutuhkan prekursor untuk mensintesis sel baru. Prekursor yang dibutuhkan antara lain zat besi, vitamin, asam amino dan stimulasi hormon. Dalam kondisi stres yang masih dapat ditolerir, maka biosintesis eritrosit (eritropoesis) tidak akan terganggu. Ini disebabkan karena darah sebagai komponen cairan tubuh sangat penting bagi kelangsungan aktivitas biologik (biokimiawi), sehingga aktivitas homeostasis darah dijaga ketat (Rosita *et al.*, 2015).

## **B.2. Pengaruh pemberian sediaan MMPK terhadap Jumlah Leukosit**

Leukosit atau sel darah putih memiliki peran yang sangat penting di dalam tubuh dalam pertahanan terhadap antigen dan infeksi masuknya benda asing (Purnomo *et al.*, 2015). Adanya peningkatan jumlah leukosit mengindikasikan bahwa tubuh mengalami infeksi. Meningkatnya jumlah leukosit atau leukosisitas pada penelitian ini bisa dijadikan indikator dalam melihat pengaruh pemberian sediaan X dalam menimbulkan efek toksik. Hasil penelitian jumlah leukosit dilakukan menggunakan Hematology Analyzer di Laboratorium Patologi Klinik, FKMK UGM. Untuk mengetahui jumlah leukosit sampel darah yang digunakan berjenis plasma. Pengambilan darah pada tikus diambil melalui sinus orbitaslis. Pengambilan darah melalui sinus orbitalis karena mudah (Millati *et al.*, 2019). Selain

mudah *recovery* luka cepat yaitu sekitar 2-3 hari. Pengambilan darah melalui pipa kapiler dengan sudut miring 45°. Pada proses pengambilan darah ditambahkan EDTA (*Ethylen diamin tetra acetat*) sebagai antikoagulan. EDTA bekerja dengan cara mengikat ion kalsium dan mengubahnya menjadi non ion sehingga menghambat koagulasi. Penghambatan kalsium penting karena jika kalsium hilang maka proses koagulasi bergenti (Subiyono *et al.*, 2016). Hasil perhitungan jumlah leukosit menggunakan HA disajikan pada Tabel IV.5.

Tabel IV.5. Jumlah leukosit tikus SD jantan dengan diberi sediaan MMPK selama 28 hari

Kelompok	Jumlah (n)	Rata-rata Jumlah Leukosit ( $10^3/\mu\text{L}$ ) + SD
Normal	5	6,18 ± 1,20499
Dosis 1 (0,018 mL/200 gBB)	5	5,64 ± 1,48672
Dosis 2 (0,09 mL/200 gBB)	5	5,98 ± 1,20706
Dosis 3 (0,45 mL/200 gBB)	5	7,02 ± 0,93113
Dosis 4 (2,25 mL/200 gBB)	5	6,16 ± 1,06911



Gambar 17.2. Grafik jumlah leukosit



Berdasarkan hasil jumlah leukosit yang diperoleh dapat diketahui bahwa jumlah leukosit kelompok kontrol  $6,18 \pm 1,20499$ , Jumlah leukosit terendah pada kelompok 2 ( $0,018 \text{ mL}/200 \text{ gBB}$ ) dengan nilai  $5,64 \pm 1,48672$  dan hasil tertinggi pada kelompok 4 ( $0,45 \text{ mL}/200 \text{ gBB}$ ) dengan nilai  $7,02 \pm 0,93113$ . Menurut Kartika *et al.* (2014) pada *breeding* tikus lokal jumlah leukosit normal tikus jantan SD  $5,74 - 11,48$  dalam  $10^3/\mu\text{L}$ . Dari hasil jumlah leukosit walaupun beberapa kelompok mengalami kenaikan ataupun penurunan jumlah leukosit namun jumlah leukosit perlakuan kelompok masih sesuai literatur (normal). Selain itu, hasil jumlah leukosit pada perlakuan dosis masih memenuhi range nilai pada kelompok kontrol, yaitu  $4,96 - 7,38$  dalam  $10^3/\mu\text{L}$ . Peningkatan jumlah leukosit bisa dikarenakan kandungan flavonoid pada sediaan X yaitu pada madu dan jintan hitam yang berperan sebagai immunodulator untuk memerangi bakteri yang berperan selama proses inflamasi yang terjadi (Yudina *et al.*, 2019). Selain itu, kandungan zat aktif pada temulawak yaitu kurkumin dapat meningkatkan leukosit karena berfungsi sebagai antiinflamasi, antimikroba, antibakteri, dan antioksidan (Septianto *et al.*, 2015).

Data hasil yang sudah didapatkan selanjutnya dianalisis menggunakan SPSS 16.0 untuk dilakukan uji normalitas menggunakan Shapiro-Wilk. Uji normalitas dilakukan untuk mengetahui data berdistribusi normal atau tidak. Hal ini karena uji normalitas menjadi syarat dalam analisis data statistik parametrik. Selain itu, uji normalitas juga menjadi syarat dalam uji ANOVA. Penggunaan uji normalitas dengan Shapiro-Wilk karena jumlah sampel yang digunakan di bawah 50 (Sativa *et al.*, 2020). Apabila signifikansi normalitas  $> 0,05$  maka data berdistribusi normal. Hasil uji normalitas pada analisis data jumlah leukosit berdistribusi normal dengan hasil nilai terlampir pada Lampiran 8.

Data yang telah berdistribusi normal dilakukan uji homogenitas untuk mengetahui sama atau tidaknya variansi-variansi dari dua distribusi data atau lebih dan sebagai syarat yang harus dipenuhi untuk uji ANOVA. Pengujian homegenitas dengan Levene *test* dikatakan homogen apabila memiliki nilai signifikasi  $> 0,5$ . Dari hasil analisis diketahui bahwa data jumlah leukosit homogen karena nilai signifikasi  $0,866 > 0,5$ . Berdasarkan hasil signifikasi uji normalitas dan homogenitas yang diperoleh maka dilakukan uji ANOVA. Hasil uji ANOVA dapat dilihat pada Lampiran 8. Uji ANOVA dilakukan untuk uji hipotesis guna mengetahui ada atau tidaknya hubungan (pengaruh) antara hasil jumlah leukosit dengan dosis sediaan X yang diberikan secara statistik. Uji ANOVA dikatakan memiliki pengaruh (diterima) apabila nilai signifikasi  $> 0,05$  dan ditolak apabila signifikasi  $< 0,05$ . Hasil uji ANOVA dengan nilai signifikasi  $0,411$  (Lampiran 8) dapat diketahui bahwa tidak ada hubungan antara jumlah leukosit dengan pemberian variasi dosis sediaan X.

### **B.3.Pengaruh pemberian sediaan MMPK terhadap Diferensial Leukosit**

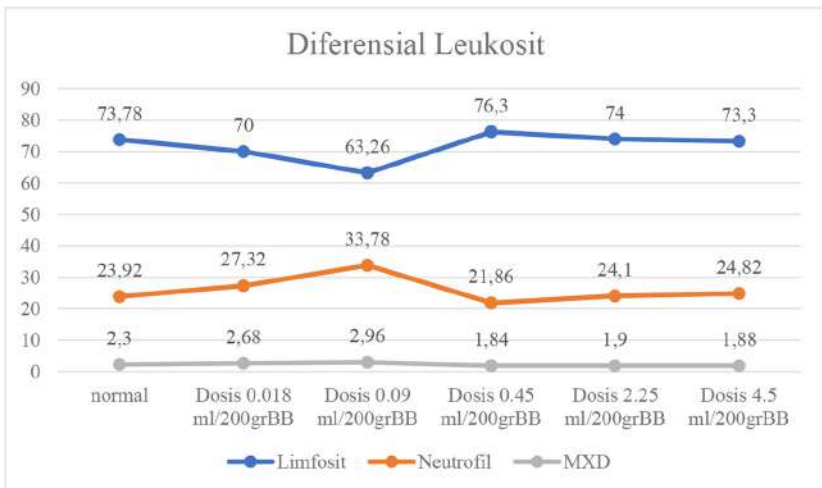
#### *Diferensial Leukosit Menggunakan Hematology Analyzer*

Diferensial leukosit ialah gambaran kondisi dari komponen darah yang dapat digunakan untuk mendeteksi status fisiologis hewan uji. Pengamatan diferensial leukosit dilakukan guna menghitung dan mengetahui presentase tiap jenis leukosit yang ada di dalam darah (Agustiana *et al.*, 2020). Alat yang digunakan untuk menghitung jenis leukosit dalam darah adalah *hematology analyzer* SY5MEX KX-21. Sampel darah sebelum diukur dengan *hematology analyzer* ditambahkan EDTA untuk mencegah koagulan. EDTA digunakan dalam beberapa macam pemeriksaan hematologi seperti penetapan kadar hemoglobin, hitung jumlah leukosit, eritrosit, trombosit,

retikulosit, hematokrit, dan penetapan laju endap darah. Pemeriksaan dengan penambahan EDTA sebaiknya dilakukan segera, namun dapat disimpan juga di dalam lemari es (4°C) selama 24 jam dengan hasil uji tanpa ada penyimpangan bermakna, kecuali untuk jumlah trombosit dan nilai hematokrit (Gandasoebrata, 2001). Hasil pengukuran diferensial leukosit dapat dilihat pada Tabel IV.6.

Tabel IV.6. Hasil diferensial leukosit dengan *hematology analyzer*

Kelompok	N	Rata-rata Jenis Leukosit (%) ± SD		
		Limfosit	Neutrofil	MXD
Normal	5	73,78 ± 4,19786	23,92 ± 4,12638	2,30 ± 0,33912
Dosis 1 (0,018 mL/200 gBB)	5	70,00 ± 4,37778	27,32 ± 3,73323	2,68 ± 0,69785
Dosis 2 (0,09 mL/200 gBB)	5	63,26 ± 8,53979	33,78 ± 8,49894	2,96 ± 0,96073
Dosis 3 (0,45 mL/200 gBB)	5	76,30 ± 3,48066	21,86 ± 3,17931	1,84 ± 0,30496
Dosis 4 (2,25 mL/200 gBB)	5	74,00 ± 1,64317	24,10 ± 1,77059	1,90 ± 0,56569



Gambar IV.3. Grafik rata-rata persentase diferensial leukosit

Berdasarkan hasil tabel dan grafik diatas dapat diketahui bahwa dengan penggunaan *hematology analyzer* SY5MEX KX-21 diferensial yang terdeteksi adalah limfosit, neutrophil, dan MXD. Nilai limfosit dan neutrofil tikus jantan galur *Sprague Dawley* menurut He *et al.* (2017) untuk jumlah limfosit adalah 65,74-88,14 % dan neutrofil 4,54-25,64 %. Dari hasil penelitian dapat diketahui bahwa rerata persentase limfosit pada perlakuan dosis masih sesuai literatur. Namun, pada rerata persentase neutrofil pada dosis 2 mengalami peningkatan dan rerata tidak sesuai literatur dan lebih dari range rerata kelompok kontrol. Hasil persentase limfosit dan neutrofil dari kelompok perlakuan dosis terjadi penurunan dan peningkatan dari perlakuan kelompok kontrol. Hal ini menandakan bahwa telah terjadi mekanisme pertahanan imunologi pada tikus yang disebabkan oleh kondisi stress karena adanya pergerakan dan penangkapan hewan uji pada waktu pemberian sediaan setiap hari dan waktu pengambilan sampel darah (Lestarinigrum *et al.*, 2012). MXD sendiri merupakan gabungan leukosit lain, yakni basophil, eosinophil, dan monosit. MXD pada kelompok kontrol memiliki persentase 1,96-2,64 %. Pada dosis 2 MXD yang diperoleh lebih dari persentase kelompok kontrol, sedangkan pada dosis 3 dan 5 nilai persentase MXD mengalami penurunan dari kelompok normal.

Analisis data untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh perbedaan perlakuan dari dosis yang diberikan dilakukan uji ANOVA. Sebelum dilakukan uji ANOVA terlebih dahulu dilakukan uji normalitas dan homogenitas. Pada uji normalitas Shapiro-Wilk diperoleh signifikansi semua kelompok perlakuan baik limfosit, neutrofil, dan MXD sebesar  $> 0,05$  yang menandakan data berdistribusi normal. Nilai homogenitas dari uji Levene *test* pada limfosit, neutrofil, dan MXD diperoleh signifikansi  $> 0,05$  yang menandakan data sudah homogen.

Uji ANOVA bisa dilakukan karena data sudah berdistribusi normal dan homogen. Hasil uji homogenitas, normalitas, dan ANOVA dapat dilihat pada Lampiran 9. Dari hasil uji ANOVA perlu dilakukan uji lanjut LSD karena nilai signifikansi  $< 0,05$ .

Tabel IV.7. Hasil uji LSD diferensial leukosit

Jenis Leukosit	Perlakuan (mL/200 gBB)	Kontrol	Dosis 0,018	Dosis 0,09	Dosis 0,45	Dosis 2,25
Limfosit	Kontrol	0	0,282	0,005*	0,470	0,949
	Dosis 0,018	0,282	0	0,062	0,079	0,256
	Dosis 0,09	0,005*	0,062	0	0,001*	0,005*
	Dosis 0,45	0,470	0,079	0,001*	0	0,510
	Dosis 2,25	0,949	0,256	0,005*	0,510	0
Neutrofil	Kontrol	0	0,308	0,006*	0,534	0,957
	Dosis 0,018	0,308	0	0,060	0,108	0,334
	Dosis 0,09	0,006*	0,060	0	0,001*	0,007*
	Dosis 0,45	0,534	0,108	0,001	0	0,499
	Dosis 2,25	0,957	0,334	0,007*	0,499	0
MXD	Kontrol	0	0,371	0,126	0,281	0,347
	Dosis 0,018	0,371	0	0,508	0,055	0,073
	Dosis 0,09	0,126	0,508	0	0,013*	0,018*
	Dosis 0,45	0,281	0,055	0,013*	0	0,887
	Dosis 2,25	0,347	0,073	0,018*	0,887	0

Keterangan (\*): berbeda signifikan

Uji lanjut (*Post-hoc*) LSD (*Least significant different*) atau BNT (Beda Nyata Terkecil) digunakan untuk mengetahui apakah setiap perlakuan yang dilakukan memiliki perbedaan yang bermakna atau tidak bermakna (Suwertayasa *et al.*, 2013). Uji LSD dihitung berdasarkan rata-rata kelompok perlakuan. Hasil uji LSD dapat diketahui memiliki perbedaan bermakna apabila nilai signifikansi

kurang dari 0,05 dan tidak memiliki perbedaan bermakna apabila signifikansi lebih dari 0,05. Berdasarkan uji LSD antara kelompok kontrol dan perlakuan dapat diketahui bahwa pada limfosit dosis 0,09 mL/200 gBB memiliki perbedaan yang bermakna terhadap kelompok kontrol dan semua kelompok perlakuan, sehingga dapat dikatakan mempunyai toksisitas terhadap persentase limfosit. Pada uji LSD untuk neutrofil dosis 0,09 mL/200 gBB memiliki perbedaan yang bermakna terhadap semua kelompok perlakuan kecuali pada dosis 0,018 mL/200 gBB dan dapat dikatakan mempunyai toksisitas terhadap persentase neutrofil. Sedangkan, pada uji LSD untuk MXD dosis 0,09 mL/200 gBB memiliki perbedaan yang bermakna terhadap perlakuan dosis 0,45 mL/200 gBB, 2,25 mL/200 gBB, dan 4,5 mL/200 gBB, namun tidak menunjukkan perbedaan terhadap kelompok kontrol. Hal ini menandakan dosis 0,09 mL/200 gBB tidak mempunyai kemampuan toksisitas terhadap persentase MXD.

Peningkatan dan penurunan persentase neutrofil dikarenakan neutrofil berfungsi sebagai agen pertahanan seluler pertama dalam proses peradangan dan pelukaan untuk membunuh mikroorganisme. Selain itu, peningkatan dan penurunan neutrofil berhubungan dengan peningkatan dan penurunan jumlah limfosit, apabila jumlah neutrofil meningkat maka jumlah limfosit menurun dan begitu juga sebaliknya. Penurunan limfosit diduga akibat adanya infeksi virus atau efek dari pemberian obat-obatan seperti sediaan X yang terdiri dari madu, jintan hitam, dan temulawak maupun karena gangguan dari lingkungan sekitar (Lestarinigrum *et al.*, 2012).

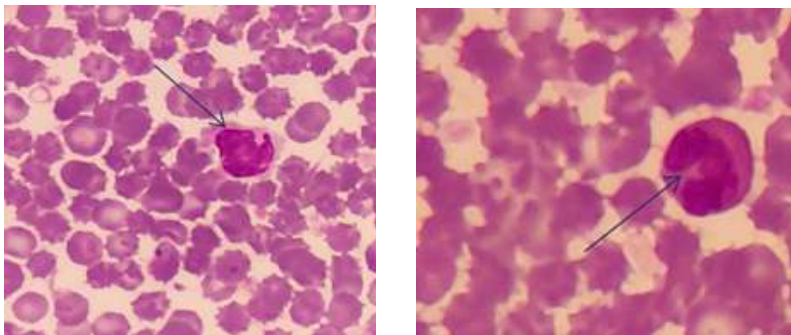
Persentase jenis leukosit pada dosis tertinggi yaitu 4,5 mL/200 gBB memiliki nilai persentase yang lebih rendah jika dibandingkan perlakuan dosis 0,018 mL/200 gBB. Hal ini bisa dikarenakan tubuh hewan uji sudah memiliki kekebalan terhadap sediaan X. Selain itu, juga bisa dikarenakan sediaan X yang diberikan dengan durasi

2 kali pada dosis tertinggi guna menghindari kematian tikus karena volume pemberian sediaan yang melebihi kapasitas lambung tikus memungkinkan terjadinya absorbs sediaan X pada pemberian durasi pertama yang menyebabkan volume sediaan yang terabsorpsi pada tubuh tidak sepenuhnya 4,5 mL/200 gBB. Penurunan neutrofil juga bisa dikarenakan penurunan daya hidup neutrofil dewasa dalam sirkulasi. Penurunan produk neutrofil dipengaruhi penurunan daya hidup neutrofil dalam sirkulasi sel, penurunan produk neutrofil dalam sumsum tulang, dan tidak efektifnya produk neutrofil pada saat kondisi infeksi akut, sepsikemia, toksemia, radiasi maupun meredanya suatu infeksi. Sedangkan, penurunan jumlah limfosit dari kondisi normal dikarenakan adanya respon terhadap pemberian sediaan X. Penurunan jumlah limfosit terjadi pada respon terhadap infeksi virus dan pada pemberian obat-obatan immunosupresif namun penurunan limfosit bersifat sementara karena sifat limfosit memiliki kemampuan merespon sistem kekebalan dengan cepat (Lestaringrum *et al.*, 2012).

### **Diferensial Leukosit Secara Manual**

Perhitungan diferensial leukosit secara manual ini merupakan tahapan lanjut dari hasil uji diferensial leukosit dengan *hematology analyzer* SY5MEX KX-21. Hal ini dilakukan untuk mengetahui persentase jenis leukosit pada MXD yang merupakan gabungan dari basofil, monosit, dan eosinofil yang tidak terdeteksi dengan *hematology analyzer*. Perhitungan jenis leukosit dengan mikroskop ini menggunakan apusan darah tepi dan pewarnaan dengan Giemsa. Pewarnaan pada pada preparat apusan darah tepi dilakukan untuk memudahkan dalam melihat berbagai jenis sel dan mengetahui morfologi dari sel-sel tersebut. Penggunaan Giemsa untuk

pewarnaan dikarenakan sangat baik untuk mengidentifikasi berbagai sel granulosit dan sel darah lainnya, menghasilkan gambaran inti yang jelas, dan tahan lama dalam iklim tropis (Ardina dan Rosalinda, 2018). Hasil diferensial leukosit dengan apusan darah tepi dapat dilihat pada Gambar 12 dan Tabel 7.



(a)

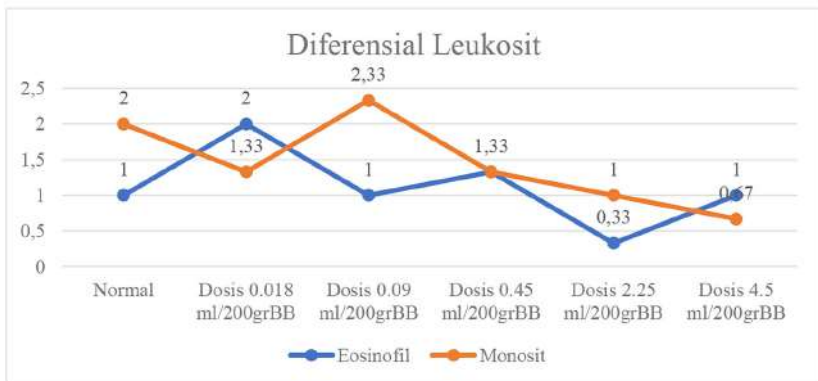
(b)

Gambar IV.4. Penampakan monosit (a) dan eosinofil (b) dengan mikroskop

Tabel IV.8. Hasil diferensial leukosit monosit dan eosinofil

Kelompok	N	Rata-rata Jenis Leukosit (%) ± SD	
		Monosit	Eosinofil
Normal	3	2,00 ± 1,00000	1,00 ± 1,00000
Dosis 1 (0,018 mL/200 gBB)	3	1,33 ± 1,15470	2,00 ± 0,00000
Dosis 2 (0,09 mL/200 gBB)	3	2,33 ± 0,57735	1,00 ± 0,00000
Dosis 3 (0,45 mL/200 gBB)	3	1,33 ± 0,57735	1,33 ± 0,88192
Dosis 4 (2,25 mL/200 gBB)	3	1,00 ± 0,00000	0,33 ± 0,33333
Dosis 5 (4,50 mL/200 gBB)	3	0,67 ± 0,57735	1,00 ± 0,57735





Gambar IV.5 Grafik persentase rata-rata eosinofil dan monosit

Hasil uji dengan mikroskop dapat diketahui persentase monosit dan eosinofil. Basofil tidak terlihat hasilnya dengan mikroskop dikarenakan untuk melihat jelas morfologi basofil lebih baik menggunakan pewarnaan Wright (Ardina dan Rosalinda, 2018). Selain itu, basophil tidak tampak pada pengamatan dikarenakan persentase basofil yang sangat sedikit dalam darah (Akrom dan Ermawati, 2009) yang mana ini menunjukkan bahwa sediaan X tidak mampu meningkatkan jumlah basofil dalam darah. Persentase monosit dan eosinofil tikus jantan SD menurut He *et al.* (2017) adalah 2,84-12,84% (monosit) dan 0,44-5,44% (eosinofil). Dari hasil pengamatan dapat diketahui bahwa rerata persentase monosit dan eosinofil masih sesuai rujukan.

Hasil uji analisis data dengan SPSS menunjukkan bahwa hasil persentase leukosit dan monosit tidak dapat diuji dengan menggunakan ANOVA karena nilai normalitas Shapiro-Wilk yang diperoleh untuk eosinofil 0,020 dan monosit 0,028. Hal ini menandakan data tidak berdistribusi normal karena nilai signifikansi untuk normalitas kurang dari 0,05. Hasil uji homogenitas dengan Levene *test* diperoleh signifikansi eosinofil 0,65 dan monosit 0,77.

Uji ANOVA tetap tidak bisa dilanjutkan walaupun data homogen dikarenakan data tidak berdistribusi normal dan harus menggunakan uji statistik non parametrik.

Uji statistik non parametrik sering disebut uji *distribution free* yang berarti bahwa uji ini tidak perlu mengikuti suatu distribusi tertentu (Doane dan Seward, 2011). Pada uji non parametrik dilakukan uji Kruskal-Wallis yang bertujuan untuk mengetahui untuk menguji apakah ada perbedaan yang signifikan antara kelompok variabel independen dengan variabel dependennya (Jamco dan Balami, 2020) yang mana uji ini kelompok independen adalah kelompok perlakuan dan kelompok dependennya persentase eosinofil dan monosit. Hasil dari uji Kruskal-Wallis diperoleh nilai signifikansi untuk eosinofil 0,305 dan monosit 0,143 yang menandakan bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna karena nilai signifikansi lebih dari 0,05. Selanjutnya, dilakukan uji Mann-Whitney untuk mengetahui ada atau tidaknya rerata antara dua kelompok perlakuan. Hasil uji Mann-Whitney dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel IV.9. Hasil uji Mann-Whitney monosit dan eosinofil

Jenis Leukosit	Perlakuan (mL/200 gBB)	Kontrol	Dosis 0,018	Dosis 0,09	Dosis 0,45	Dosis 2,25	Dosis 4,5
Monosit	Kontrol	0	0,487	0,637	0,346	0,121	0,105
	Dosis 0,018	0,487	0	0,197	0,814	0,480	0,361
	Dosis 0,09	0,637	0,197	0	0,099	0,034*	0,043*
	Dosis 0,45	0,346	0,814	0,099	0	0,317	0,197
	Dosis 2,25	0,121	0,480	0,034*	0,317	0	0,317
	Dosis 4,5	0,105	0,361	0,043*	0,197	0,317	0
Eosinofil	Kontrol	0	0,121	1,000	0,822	0,346	1,000
	Dosis 0,018	0,121	0	0,025*	0,487	0,034*	0,121
	Dosis 0,09	1,000	0,025*	0	1,000	0,114	1,000
	Dosis 0,45	0,822	0,487	1,000	0	0,346	0,822
	Dosis 2,25	0,346	0,034*	0,114	0,346	0	0,346
	Dosis 4,5	1,000	0,121	1,000	0,822	0,346	0

Keterangan (\*): berbeda signifikan

Hasil uji Mann-Whitney pada difrensial leukosit dengan mikroskop untuk monosit dan eosinofil guna melihat perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan dengan melihat nilai signifikansi antara kelompok kontrol dan perlakuan dosis. Hasil uji Mann-Whitney dikatakan berbeda signifikan atau memiliki perbedaan bermakna apabila  $< 0,05$  dan dikatakan tidak memiliki perbedaan bermakna jika  $> 0,05$ . Hasil signifikansi pada monosit antara kelompok kontrol dengan perlakuan dosis tidak memiliki perbedaan bermakna dan begitu juga pada eosinofil. Hal ini menandakan sediaan X tidak mempunyai kemampuan toksisitas terhadap persentase monosit dan eosinofil. Hal ini juga sesuai pada uji LSD untuk MXD yang mana tidak mempunyai kemampuan toksisitas.

Eosinofil menjadi salah satu bagian dari sel darah putih yang berperan dalam sistem pertahanan dengan merespon infeksi maupun alergi, sehingga eosinofil akan meningkat jumlahnya dan langsung melakukan migrasi ketika terdapat rangsangan atau infeksi. Adanya peningkatan jumlah persentase eosinofil tetapi masih masuk dalam batas normal hal ini menunjukkan bahwa perlakuan dosis sediaan X tidak menimbulkan respon alergi pada tikus (Septianto *et al.*, 2015). Sel eosinofil dihasilkan oleh sumsum tulang dan setelah matang akan memasuki darah dan ikut dalam sirkulasi darah (Jatmiko, 2015). Flavonoid pada sediaan X dapat menghambat aktivasi IL-5 sehingga jumlah eosinofil akan berkurang (Trisia dan Imun, 2017). IL-5 merangsang perkembangan dan aktivasi eosinofil. IL-5 memberikan sinyal penting untuk ekspansi dan pergerakan dari sumsum tulang setelah terpapar baik alergen maupun infeksi (Darmadi *et al.*, 2015).

Sel monosit memiliki fungsi sebagai agen makrofag yang memfagosit benda asing yang masuk ke dalam tubuh. Adanya inflamasi kronis atau proses peradangan akan merangsang terjadinya monositosis atau peningkatan jumlah monosit (Agustiana *et al.*,

2020). Sediaan X tidak menimbulkan efek toksisitas pada sel monosit karena sel monosit memiliki kemampuan fagositosis yang tahan lama sebagai respon terhadap kekebalan tubuh dan memberikan kontribusi langsung pada perbaikan jaringan yang rusak. Terjadinya penurunan monosit ini diduga karena tidak terjadi peningkatan aktifitas fagositosis terhadap benda asing dalam perbaikan jaringan yang rusak karena kondisi hewan percobaan yang tergolong dalam kondisi normal (Lestarinigrum *et al.*, 2012). Aktivitas antioksidan flavonoid pada sediaan X menjaga keutuhan membran sel monosit, sehingga monosit tetap viabel (hidup, tumbuh serta bertahan hidup) dan dapat mencegah terjadinya kematian sel. Saat proses fagositosis, monosit akan menghasilkan radikal bebas yang akan bereaksi dengan membran sel bakteri dan melisis sel bakteri. Akan tetapi, radikal bebas ini tidak hanya merusak sel bakteri, sel monosit juga lisis. Flavonoid dari sediaan X mampu melindungi membran lipid sel monosit terhadap reaksi yang merusak (Supriyana *et al.*, 2019). Hal ini menandakan sediaan X tidak memiliki toksisitas terhadap persentase monosit.

### **C. Pengaruh pemberian MMPK terhadap Fungsi Hati**

Analisis kadar SGOT diperlukan untuk mengetahui kerusakan sel hepatosit, seperti adanya nekrosis hati. Kelemahan menggunakan metode SGOT adalah tidak spesifik terhadap kerusakan hati. Hal ini disebabkan karena SGOT juga diekspresikan di dalam sel darah merah dan jaringan lainnya (otot) secara signifikan. Sama seperti SGOT, SGPT dilepaskan dari hepatosit yang mengalami kerusakan atau perubahan permeabilitas membran sel ke dalam darah. Kadar SGPT adalah parameter yang paling sering digunakan untuk menentukan adanya hepatotoksitas dan dianggap sebagai gold standard karena sensitivitas dan spesifisitas yang cukup baik. Hasil analisis

deskriptif menunjukkan rata-rata kadar SGPT serum darah tikus *Sparague Dawley* cenderung menurun seiring dengan peningkatan dosis sediaan X terhadap kelompok normal. Rata-rata kadar SGPT untuk kelompok normal ( $52,660 \pm 9,20$  U/L), kelompok dosis 0,018 mL/200gBB ( $52,560 \pm 9,21$  U/L), kelompok dosis 0,09 mL/200gBB ( $53,920 \pm 9,67$  U/L), kelompok dosis 0,45 mL/200gBB ( $45,260 \pm 4,69$  U/L), kelompok dosis 2,25 mL/200gBB ( $48,340 \pm 3,35$  U/L), dan kelompok dosis 4,50 mL/200gBB ( $35,680 \pm 3,74$  U/L). Hasil uji *One-Way ANOVA* didapatkan nilai signifikansi 0,004 ( $p < 0,05$ ) yang berarti terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok.

Rata-rata kadar SGOT dan SGPT pada tikus *Sparague Dawley* setelah pemberian sediaan X selama 28 hari dapat dilihat pada tabel IV.10

Tabel II. 10. Rata-rata kadar SGOT dan SGPT tikus (U/L) tikus SD yang diberi sediaan MMPK

Kelompok	Dosis sediaan minyak biji jantan hitam (mL/200gBB)	Rata-rata kadar SGOT (U/L)	Rata-rata kadar SGPT (U/L)
		Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD
Kontrol Normal	-	268,520 $\pm$ 36,98	52,660 $\pm$ 9,20
Perlakuan dosis 1	0,018	271,060 $\pm$ 49,44 <sup>a</sup>	52,560 $\pm$ 9,21 <sup>a</sup>
f Perlakuan dosis 2	0,09	237,960 $\pm$ 18,58 <sup>a</sup>	53,920 $\pm$ 9,67 <sup>a</sup>
Perlakuan dosis 3	0,45	215,400 $\pm$ 32,39 <sup>b</sup>	45,260 $\pm$ 4,69 <sup>a</sup>
Perlakuan dosis 4	2,25	216,980 $\pm$ 15,36 <sup>b</sup>	48,340 $\pm$ 3,35 <sup>a</sup>

Keterangan: a = tidak berbeda signifikan ( $p > 0,05$ ) terhadap kelompok kontrol normal  
 b = berbeda signifikan ( $p < 0,05$ ) terhadap kelompok kontrol normal

Berdasarkan tabel IV.10, menunjukkan adanya perbedaan signifikan rata-rata kadar SGOT serum tikus *Sparague Dawley* antar kelompok perlakuan. Kadar SGOT tertinggi pada kelompok dosis

0,018 mL/200gBB sebesar  $271,060 \pm 49,44$  U/L, sedangkan kadar SGOT terendah pada kelompok dosis 4,50 mL/200gBB sebesar  $167,920 \pm 27,63$  U/L, dan kadar SGOT kelompok kontrol normal sebesar  $268,520 \pm 36,98$  U/L. Dapat dinyatakan bahwa rata-rata kadar SGOT kelompok normal dengan kelompok dosis 0,018 mL/200gBB dan kelompok dosis 0,09 mL/200gBB tidak memiliki perbedaan secara signifikan dengan nilai signifikansi 0,902 dan 0,149 ( $p > 0.05$ ). Sedangkan untuk kelompok dosis 0,45 mL/200gBB, kelompok dosis 2,25 mL/200gBB, dan kelompok dosis 4,50 mL/200gBB memiliki perbedaan secara signifikan dengan kelompok normal, dilihat dari nilai signifikansi sebesar 0,015, 0,018, dan 0,000 ( $p < 0,05$ ), hal ini menunjukkan bahwa terjadi penurunan kadar SGOT secara signifikan dibandingkan kelompok normal. Menurut hasil penelitian Panjaitan dkk (2007) hewan uji kelompok kontrol memiliki kadar enzim SGOT sebesar 330.87 U/L. Petterino dan Storino (2006) menyatakan, rata-rata kadar enzim SGOT pada tikus *Sprague Dawley* dalam kondisi normal (tanpa perlakuan) memiliki nilai maksimum 201.89 U/L dan nilai minimum 56.1 U/L. Oleh karena itu penurunan kadar SGOT dianggap tidak berpengaruh toksik, hanya berbeda secara statistik karena rata-rata kadar SGOT masih masuk kedalam range normal.

Berdasarkan tabel IV.10, menunjukkan adanya perbedaan signifikan rata-rata kadar SGPT serum tikus *Sparague Dawley* antar kelompok perlakuan. Kadar SGPT tertinggi pada kelompok kontrol sebesar  $52,660 \pm 9,20$  U/L, sedangkan kadar SGPT terendah pada kelompok dosis 4,50 mL/200gBB sebesar  $35,680 \pm 3,74$  U/L. Dapat dinyatakan bahwa rata-rata kadar SGPT kelompok normal dengan kelompok dosis 0,018 mL/200gBB, kelompok dosis 0,09 mL/200gBB, kelompok dosis 0,45 mL/200gBB, dan kelompok dosis 2,25 mL/200gBB tidak memiliki perbedaan secara signifikan dengan nilai signifikansi 0,983, 0,784, 0,117, dan 0,352 ( $p > 0.05$ ). Sedangkan

untuk kelompok dosis 4,50 mL/200gBB memiliki perbedaan secara signifikan dengan kelompok normal, dilihat dari nilai signifikansi sebesar 0,001 ( $p < 0,05$ ). Petterino dan Storino (2006) menyatakan, rata-rata kadar enzim SGPT pada tikus Sprague dawley dalam kondisi normal (tanpa perlakuan) memiliki nilai maksimum 218.1 U/l dan nilai minimum 34.9 U/l. Kadar SGPT normal pada tikus sebesar 21-52 U/L (Sujono dkk, 2012). Sehingga dapat disimpulkan bahwa terjadi penurunan kadar SGPT pada dosis 4,50 mL/200gBB namun masih masuk kedalam range normal, secara keseluruhan rata-rata kadar SGOT antar kelompok tidak memiliki perbedaan secara signifikan.

Berdasarkan hasil analisis kadar rata-rata SGOT dan SGPT pada serum darah tikus tersebut, hampir tidak ada perbedaan secara signifikan antar kelompok, namun terjadi penurunan kadar pada beberapa kelompok dosis yang bermakna terhadap kelompok kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa sediaan minyak biji jintan hitam dapat menurunkan kadar SGOT dan SGPT pada serum darah tikus. Penurunan kadar SGOT dan SGPT pada serum darah tikus berhubungan dengan efek hepatoprotektor yang dimiliki oleh *thymoquinone* sebagai zat aktif yang terkandung dalam jintan hitam. Sejalan dengan penelitian yang dilakukan Akrom dkk (2015) menyebutkan bahwa *thymoquinone* memiliki efek hepatoprotektor dilihat dari penurunan kadar SGOT dan SGPT pada tikus yang diinduksi aloksan. *Thymoquinone* telah dilaporkan dapat mencegah kerusakan hati pada tikus melalui mekanismenya sebagai antioksidan dan antiinflamasi (Hiwarima dan Susianti, 2019). Selain itu Temulawak juga diketahui mempunyai efek sebagai hepatoprotektor (Candra, 2013). Menurut penelitian yang dilakukan Candra (2013) menyatakan bahwa pemberian temulawak 7 hari berturut-turut mampu menurunkan nilai SGOT dan SGPT ayam yang diinduksi

parasetamol. Sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Sirait dkk (2014) menjelaskan bahwa terdapat pengaruh pemberian rimpang temulawak dalam mencegah kerusakan hepar tikus jantan dewasa galur *Sprague Dawley* yang diinduksi aspirin. Pemberian rimpang temulawak dengan dosis 2,6 g/kgBB dan 5,2 g/kgBB memiliki efek hepatoprotektif terhadap hepar tikus yang diinduksi aspirin dibandingkan dengan kelompok yang hanya diberi rimpang temulawak dosis 1,3 g/kgBB. Efek kurkumin sebagai antioksidan yang mampu menangkap ion superoksida dan memutus rantai antar ion superoksida ( $O_2^-$ ) sehingga mencegah kerusakan sel hepar. Curcumin juga mampu meningkatkan *gluthation S-transferase* (GST) dan mampu menghambat beberapa faktor proinflamasi, ekspresi gen dan replikasi virus hepatitis B melalui *downregulation* dari PGC- $1\alpha$ , sehingga dapat disimpulkan bahwa curcumin dapat dijadikan alternatif hepatoprotektor pada pasien hepatitis kronis (Marinda, 2014). Selain jintan hitam dan temulawak, madu juga diketahui memiliki efek sebagai hepatoprotektor. Penelitian yang dilakukan Avesina dan Ramadhian (2015) menyatakan bahwa Madu memiliki efek hepatoprotektor terhadap zat toksik, terlihat pada penurunan kadar enzim SGOT dan SGPT yang merupakan penanda kerusakan sel hati atau inflamasi, Efek proteksi madu karena terdapat senyawa biologi aktif seperti vitamin, flavonoid, dan antioksidan yang bekerja bersama melawan radikal bebas.

Dalam penelitian ini tidak dijumpai adanya kenaikan kadar SGOT maupun kadar SGPT secara signifikan yang terjadi pada semua kelompok dosis, namun pada beberapa dosis terdapat penurunan kadar SGOT dan SGPT terhadap kontrol normal. Penurunan tersebut bermakna secara statistik namun tidak bermakna secara klinis dikarenakan kadar SGOT dan SGPT masih masuk ke dalam range normal teoritis. Sehingga dapat disimpulkan bahwa



pemberian sediaan X selama 28 hari tidak menyebabkan efek toksik terhadap fungsi hati yang dilihat dari kadar SGOT dan SGPT serum darah tikus yang tidak memiliki perbedaan secara signifikan antar kelompok dosis. Terdapat beberapa kelompok dosis yang dapat menurunkan kadar SGOT dan SGPT yang signifikan, namun masih dalam batas normal.

#### **D. Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan diperoleh kesimpulan:

1. Pemberian sediaan MMPK selama 28 hari tidak berpengaruh terhadap jumlah eritrosit, hematokrit dan leukosit tikus jantan galur *Sprague Dawley*.
2. Pemberian sediaan MMPK selama 28 hari tidak berpengaruh terhadap persentase limfosit, eosinofil, dan monosit tikus jantan galur *Sprague Dawley*. Namun, berpengaruh terhadap persentase neutrofil pada perlakuan dosis 0,09 mL/200 gBB.
3. Pemberian sediaan MMPK selama 28 hari tidak berpengaruh terhadap fungsi hati.

## DAFTAR PUSTAKA

- Al Ghamdi MS, 2001. The antiinflamator, analgesic and antipyretic activity of *Nigella sativa*, 55 : 379-382. Departemen of Pharmacology King Faisal University Collage of Medicine. [www.elseiver.com](http://www.elseiver.com). Desember 2002
- Akrom, 2012. Pengembangan fraksi kaya timokuinon MBJH sebagai herbal terstandar agen imunomodulator hematorpotektor Untuk penderita kanker dengan kemoterapi, Laporan Penelitian Hibah Bersaing, LPP UAD, Yogyakarta
- Akrom, 2013. Efek pemberian MBJH Selama 21 Hari terhadap Gambaran Fungsi hepar, ginjal dan gambaran darah tepi tikus SD, Laporan Penelitian Mandiri, LPP UAD, Yogyakarta
- Akrom, 2013. Mekanisme kemoprefentif ekstrak heksan BJH pada tikus SD diinduksi DMBA:kajian antioksidan dan imunomodulator, Disertasi, Program Doktor Ilmu Kedokteran dan kesehatan FK UGM, Yogyakarta
- Akrom, Khoiri, N., Suhana, Y., Mustofa, 2007. Pengaruh pemberian ekstrak etanol biji Jinten hitam (*N.sativa* Lour) terhadap aktivitas fagositosis dan sekresi ROI makrofag mencit jantan galur Balb C secara in vitro, Seminar Nasional Tanaman Obat dan obat tradisional, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional Badan Litbang Kesehatan, Departemen Kesehatan RI, Solo, 10-11 Juli 2007

- Akrom, Mustofa, Mubarika, S., Setyanto, HNE., 2013. The chemopreventive and immunomodulator effect of black seed oil on SD rat induced by DMBA, Proceeding enhancing International collaborative research on education, sciences and humanities, Naga City, Philipines, June 19-21, 2013
- Akrom, Nurani, L.N., Hidayati, T., 2007. Kajian aktivitas imunomodulator agen kemopreventif isolate aktif ekstrak *N.sativa* pada kanker payudara akibat paparan DMBA pada tikus putih, Laporan Penelitian, LPP UAD, Yogyakarta
- Akrom, Nurani, L.N., Hidayati, T., 2008. Kajian aktivitas imunomodulator agen kemopreventif isolate aktif ekstrak *N.sativa* pada kanker payudara akibat paparan DMBA pada tikus putih, Laporan Penelitian, LPP UAD, Yogyakarta
- Akrom, Wijaya, A., Djannah, S.N., 2007. Effect of the ethanolic extract of *Nigella sativa* on phagocytosis activity of macrophage male swiss mice during infection of *Listeria monocytogenes*, The 4th International Eijkman Conference, Bali, 15-18 November 2007
- Akrom, Khoiri, N., Suhana, Y., Mustofa, 2007. Pengaruh pemberian ekstrak etanol biji Jinten hitam (*N.sativa* Lour) terhadap aktivitas fagositosis dan sekresi ROI makrofag mencit jantan galur Balb C secara in vitro, Seminar Nasional Tanaman Obat dan obat tradisional, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional Badan Litbang Kesehatan, Departemen Kesehatan RI, Solo, 10-11 Juli 2007
- Akrom, Wijaya, A., Djannah, S.N., 2007. Effect of the ethanolic extract of *Nigella sativa* on phagocytosis activity of macrophage male swiss mice during infection of *Listeria monocytogenes*, The 4th International Eijkman Conference, Bali, 15-18 November 2007

- Ali, R., Shahid, A., Ali, N., Hasan, S., Majed, F., & Sultana, S. (2016). Amelioration of Benzo[a]pyrene-induced oxidative stress and pulmonary toxicity by Naringenin in Wistar rats: A plausible role of COX-2 and NF- $\kappa$ B. *Human & Experimental Toxicology*, 36(4), 349–364. doi:10.1177/0960327116650009
- Arora, A, Siddiqui, I.A., Shukla, Y., 2004. Modulation of p53 in 7,12- dimethylbenz[a]anthracene-induced skin tumors by diallyl sulfide in Swiss albino mice, *Mol Cancer Ther.*,3(11):1459-66.
- Badary OA, Abd-Ellah MF, El-Mahdy MA, Salama SA, Hamada FM, 2007. Anticlastogenic activity of thymoquinone against benzo(a)pyrene in mice, *Food Chem Toxicol*, 45(1):88-92
- Badary OA, Al-Shabanah OA, Nagi MN, Al-Rikabi AC, Elmazar MM, 1999. Inhibition of benzo(a)pyrene-induced forestomach carcinogenesis in mice by thymoquinone, *Eur J Cancer Prev.*,8(5):435-40
- Badary OA, Gamal El-Din AM, 2001. Inhibitory effects of thymoquinone against 20-methylcholanthrene-induced fibrosarcoma tumorigenesis., *Cancer Detect Prev.*,25(4):362-8
- Bajak, E.Z., 2005. Genotoxic stress:novel biomarkers and detection methods uncovering RNAs role in epigenetics of carcinogenesis, Dissertation, Karolinska University Press, Sweden
- Bala, K., Ambwani, K., Gohil, N.K. 2011. Effect of different mitogens and serum concentration on HUVEC morphology and characteristics: Implication on use of higher passage cells. *Tissue and Cell* 43: 216-22.
- Baratawidjaja, K.G. 2004. *Imunologi Dasar*. Jakarta : Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- Baratawidjaja, K.G. 2006. *Imunologi Dasar*. Jakarta : Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

- Barletta, E., G. Gorini, P. Vinels, L. Miligi, L. Davico, G. Mugnai, S. Ciolli, F. Leoni, M. Bertini, G. Matullo, and A. S. Costantini. 2004. Ras gene mutations in patients with acute myeloid leukemia and exposure to chemical agents. *Carcinogenesis*, 25(5), 749-755
- Baudin, B., Bruneel, A., Bosselut, N., Vaubourdolle, M. 2007. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nature Protocols* 2(3): 481-85.
- Budiono, K., 2006. STUDI KONSUMSI ROKOK UMAT ISLAM INDONESIA, makalah
- Cines, D.B., Pollak, E.S., Buck, C.A., Loscalzo, J., Zimmerman, G.A., McEver, R.P., Pober, J.S., Wick, T.M., Konkle, B.A., Schwartz, B.S., Barnathan, E.S., McCrae, K.R., Hug, B.A., Schmidt, A.M., Stern, D.M. 1998. Endothelial Cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders. *Blood* 91(10): 3527-61.
- Dale, M. M., Foreman, J. C. and Fan, T.D. (ed.) 1994. *Textbook of Immunopharmacology*. Oxford : Blackwell Scientific Publications
- Depkes RI, 2000, *Pedoman Pelaksanaan Pedoman Uji Klinik Obat Tradisional*, Departemen Kesehatan R. I., Jakarta
- Depkes RI, 2004, *Masalah Rokok dan Penanggulangannya di Indonesia*, Departemen Kesehatan R. I., Jakarta
- El-Kadi A, Kandil O. 1986, Effect of *Nigella sativa* (the black seed) on immunity. *Proceeding of the 4<sup>th</sup> International Conference on Islamic Medicine*, Kuwait. *Bull Islamic Med*; 4: 344-8.
- El Sayed I and Fukushima S, 2003. Chemopreventive potential of volatile oil from black cumin (*Nigella sativa* L) seeds against rat colon carcinogenesis. *J. of Nutrit and Cancer*. 45 (2):195-202

- Farrah, K.M., 2001. Mechanisms of the hypoglycaemic and immunopotentiating effects of *Nigella sativa* L. oil in streptozotocin-induced diabetic hamsters
- Freshney, R.I. Culture of Animal Cells: A manual of basic technique. Fourth ed. New York: Wiley-Liss. p 372.
- Galley, H.F., Webster, N.R. 2004. Physiology of the Endothelium. *British Journal of Anaesthesia* 93(1): 105-13.
- Gibbs, J.B., 2000, Mechanism-based Target Identification and Drug Discovery in Cancer Research, *Science* vol 287, 1969-1973
- Gimbrone, M.A., Cotran, R.S., Folkman, J. 1974. Human vascular endothelial cells in culture: Growth and DNA synthesis. *J Cell Biol* 60: 674-84.
- Harborne J.B., 1987, Metode Fitokimia, Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Imam Sudiro, Edisi kedua, Penerbit ITB, Bandung.
- Haq, A., Lobo, P.I., Al Tufail, M., Rama, N., R., Al Sedairy, S., T., 1999. Immunomodulatory effect of *Nigella sativa* proteins fractionated by ion exchange chromatography, *Int. J. Immunopharmacol.*, 21(4):283-95
- Hidayati, T., Akrom. Pengaruh ekstrak etanol jinten hitam terhadap aktivitas fagositosis makrofag mencit Swiss yang diinfeksi *P.berghei* secara *in vitro*, Prosiding seminar nasional farmakoterapi, Program Profesi Apoteker Fakultas Farmasi UAD, Yogyakarta: 14 Januari 2006
- Hodgson E., 2001. *In vitro* human phase I metabolism of xenobiotics I: pesticides and related chemicals used in agriculture and public health, September 2001., *J Biochem Mol Toxicol.* , 15(6), 296-299

- Iddalmadeniya,S.S., Thabrew, M.L., Wickramasinghe, S.M.D.N., Ratnatunge, N., Thammitiyagodage, M.G., 2006. A long-term investigation of the anti-hepatocarcinogenic potential of an indigenous medicine comprised of *Nigella sativa*, *Hemidesmus indicus* and *Smilax gabra*, *J.Carcinog*, Oct 18; 8(1):6
- Iddalmadeniya,S.S., Thabrew, M.L., Wickramasinghe, S.M.D.N., Ratnatunge, N., Thammitiyagodage, M.G., 2003. Potection against diethylnitrosoamine-induced hepatocarcinogenesis by an indegius medicine compromised comprised of *Nigella sativa*, *Hemidesmus indicus* and *Smilax gabra*, *J.Carcinog*, Oct 18; 2(1):6
- Jaffe, E.A., Nachman, R.L., Becker, C.G., Minick, C.R. 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical vein. *J Clin Invest* 52:2745-56.
- Jones, CLA.,2000. Herbal Aids For Cancer. Nutrition Science News dalam *Chiro.org*. [www. Chiro.org](http://www.Chiro.org).
- King, R.J.B., 2000, *Cancer Biology*, 2<sup>nd</sup> edition, Pearson Education Ltd., London
- Kresno, S.B., 2001. *Imunologi : Dignosis dan Prosedur Laboratorium*. Ed. Keempat. Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- Kubatka, P., Ahlersova E., Ahlers I., Bojkova B., Kalicka K., Adamekova E., Markova M., Chamilova M. and Cermakova M., 2002, Variability of Mammary Carcinogenesis Induction in Female Sprague-Dawley and Wista: Han Rats : the Effect of Season and Age, *Physiol. Res.* , 51,633-640
- MacDonald,F.,and Ford, C.H.J., 1997, *Molecular Biology of Cancer*, Bios Scientific Publishers, Oxford

- Meiyanto, E., Susilowati, Sitarina, Arifin, I., 2004a, Efek Antimutagenik ekstrak etanolik daun *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. pada kanker payudara tikus terinduksi DMBA melalui induksi enzim GST hepar dalam Seminar “Perhimpunan Biokimia dan Biologi Molekuler Indonesia” Yogyakarta.
- Meiyanto, E., Sugiyanto, and R. Murwanti, 2004b. Efek Anti Karsinogenesis Ekstrak Etanol Tanaman Daun Dewa (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr) pada Kanker Payudara Tikus yang diinduksi dengan Dimetilbenz(a)antrazena (DMBA). Penelitian Hibah Bersaing, 6-12
- Melendez-Colon, V.J., Luch, A., Seidel, A., Baird, W.M., 2000. Formation of stable DNA adducts and apurinic sites upon metabolic activation of bay and fjord region polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell cultures, *Chem Res Toxicol.*, 13(1), 10-17
- Melendez-Colon, V.J., Luch, A., Seidel, A., Baird, W.M., 1999. Cancer initiation by polycyclic aromatic hydrocarbons results from formation of stable DNA adducts rather than apurinic sites, *Carcinogenesis*. 20(10), 1885-1891
- Miyata, M., Kudo, G., Lee, Y., Yang, T.J., Gelboin, H.V., Gonzalez, F.J., 1999, Targeted Disruption of the Microsomal Epoxide Hydrolase Gene, *J. Biol. Chem.*, 274, 23963-23968.
- Mousa, D., Dilsiz, N., Gumushan, H., 2004. Antitumor activity of an ethanol extract of *Nigella sativa* seeds, *Biologia-Bratislava*, 59(6):735-40
- Nachman, R.L., Jaffe, E.A. 2004. Endothelial cell culture: beginnings of modern vascular biology. *J Clin Invest* 114: 1037-40.
- Nickavar B., Mojab, F., Javidnia, K., Amoli, M., A., 2003. Chemical composition of the fixed and volatile oils of *Nigella sativa* L. from Iran, *J. Naturforsch*, 58(9-10):629-31



- Pitot, H.C., and Dragan, Y., P., 2001, Chemical Carcinogenesis, in Curtis D Klaasen, Casarett & Doull's: Toxicology, The Basic Science of Poisons, 6<sup>th</sup> ed, Mc. Graw Hill. Medical Publishing Division, New York, p. 241-280.
- Purnomosari, D., Paramita, D.K., Aryandono, T., Pals, G., Van Diest, P.J., 2005. A novel BRCA2 mutation in an Indonesian family found with a new, rapid, and sensitive mutation detection method based on pooled denaturing gradient gel electrophoresis and targeted sequencing, *J.Clin.Pathol*, 58, 493-499
- Randhawa, M.A., Al-Ghamdi, MS., 2002, A review of the pharmacotherapeutic effects of *Nigella sativa*, *Pakistan J. Med. Res.* Vol.41, No.2
- Robbins, S.L., Contran, R.S., and Kumar, V., 1984, Neoplasia, *Pathologic Basic of Disease*; 3<sup>rd</sup>., W.B., Saunders Co., Philadelphia, 215-249.
- Roitt, I., 1997, *Roitt's Essential Immunologi*, Ninth Edition, Blackwell Science Ltd, London, 380-385
- Salem, M.L. & Hossain, M.S., 2000. Protective effect of black seed oil from *Nigella sativa* against murine cytomegalovirus infection, *Int. J. Pharmacol.*, 22(9):729-40
- Sangat, H.M., Zuhud, E.A.M. dan Damayanti, E.K. 2000. *Kamus Penyakit dan Tumbuhan Obat Indonesia*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia
- Shimada, T., 2006. Xenobiotic – metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon, *Drug. Metab Pharmacocinet*, 27(4), 257-276
- Shimada, T., Oda, Y., Gillam, E.M.J., Guencerich, P., Inoue, K., 2001, Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbon and other carcinogen by cytochromes P450 1A1 and P450 1B1 allelic variants and other human cytochromes P450 in salmonella

typimutium NM2009, Drug Metabolism and Disposition, 29 (9), 1176-1181

Singletary K, MacDonald C, Iovinelli M, Fisher C, Wallig M. 1998. Effect of the beta-diketones diferuloylmethane (curcumin) and dibenzoylmethane on rat mammary DNA adducts and tumors induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene, Carcinogenesis, 19(6), 1039-1043.

Singletary KW, Stansbury MJ, Giusti M, Van Breemen RB, Wallig M, Rimando A, 2003. Inhibition of rat mammary tumorigenesis by concord grape juice constituents, J Agric Food Chem; 3;51(25), 7280-7286.

Spink, D.C., Spink, B.C., Cao, J.Q., Pasquele, J.A., Pentecost, B.T., Fasco, M.J., Li, Y., Sutter, T.R., 1998. Differential expression of CYP1A1 and CYP1B1 in human breast epithelial cells and breast tumor cells, Carcinogenesis, 19(2), 291-298

Surh, Y., 1999, Molecular Mechanism of Chemopreventive Effect of Selected Dietary and Medicinal Phenolic Substances, Mut Res, 428, 305-327

Surh, Y., 2002, Anti-tumor promoting potential of selected of spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities : a short review, Food and Chem. Tox. 40 ,1091-1097

Surh, Y., 2003. Cancer Chemoprevention With Dietary Phytochemicals. Nature Revs.3. ; 768-80

Syamsuhidayat, S.S., dan Hutapea J.R., 1997, Inventaris Tanaman Obat Indonesia, Departemen Kesehatan RI, Jakarta

Tanaka, A. 1994. Primary culture of HUVEC. A handout.

Tasminatun,S., 2005, Efek antikarsinogenesis ekstrak etanolik daun *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. setelah inisiasi pada kanker payudara dan cerviks tikus terinduksi DMBA, Tesis, Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

- Tasminatun,S., dan Makiyah, SNN, 2005, Efek ekstrak etanolik biji *Nigella sativa* pada mencit terinfeksi *Stafilococcus aureus*, Laporan Penelitian, Fakultas Kedokteran UMY, Yogyakarta.
- Tjindarbumi,D, dan Mangunkusumo,R., 2002, Cancer in Indonesia, Present and Future, *Jpn J Clin Oncol* ; 32 (Supplement 1) ,17-21
- Tsai, E., Wang, S., Lee, J., and Hung, M., 2001, Act Activation by Estrogen in Estrogen Receptor-negative Breast Cancer Cells, *Cancer Res.*, 61, 8390-8392
- Tullo, A., and E. Sbisa. 2002. Molecular characterization of p53 mutations in primary and secondary liver tumors. *Diagnostic and Therapeutic perspectives. Molecular Biotechnology*, 21, 265-278.
- Underwood, 2004. *General and systematic pathology*, fourth edition, Churchill livingstone, China
- Van der veen, R.C., 2001. Nitric oxide and T helper cell immunity, *International immunopharmacology*,1, 1491-500
- Van Leeuwen, E.B.M, Molema, G., De Jong, K.P., Van Luyn, M.J.A., Dijk, F., Sloof, M.J.H., Ruiters, M.H.J., Van De Meer, J. 2000. One-step methode for endothelial cell isolation from large human blood vessels using fibrin glue. *Laboratory Investigation* 80(6): 987-9.
- Velde CJH, 1999, Tumor Cerviks dalam Velde CJH,Bosman FT, Wagener DJT, *Onkologi*, Edisi 5, Panitia Kanker RSUP Dr Sardjito Yogyakarta,467-92
- Wagner, 1984, *Natural Products: their chemisty and biological significance*, Longman, England
- Weber, K.C., Honorio, K.M., Bruni, A.T., Silva, B.F., 2006, The Use Classification Methods for Modeling the Antioxidant Activity of Flavonoid Compounds, *J. Mol. Model*, 12, 915-920

- Wu, S.Q., Aird, W.C. 2005. Thrombin, TNF-alpha, and LPS exert overlapping but nonidentical effects on gene expression in endothelial cells and vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289(2):H873-885.
- Zardi, E.M., Zardi, D.M., Cacciapaglia, F., Dobrina, A., Amoroso, A., Picardi, A., Afeltra, A. 2005. Endothelial dysfunction and activation as an expression of disease: role of prostacyclin analogs. *International Immunopharmacology* 5:437-459.
- Abbas. A.K., Litchman, A.H., 2004. *Basic Immunology: Function and disorder and the immune system*, Sccond edition, Elsevier, Shang hai
- Adrianjah, H dan Adam, J., 2006. *Sindroma Metabolik: Pengertian, Epidemiologi, dan Criteria Diagnosis*. Informasi laboratorium prodia No.4/2006.
- Akrom, 2004. *Efek ekstrak etanol Herba meniran (Phyllanthus niruri L) Terhadap Respon Imun Seluler Mencit Galur SWISS Jantan Selama Diinfeksi Plasmodium Berghei : Studi imunomodular fitokimia*, Tesis, Pasca Sarjana UGM, Yogyakarta
- Akrom, 2011. *Pengaruh pemberian MBJH terhadap jumlah limfosit sitolitik pada tikus SD yang diinduksi DMBA (DIMETHYLBENZANTRACENE)*, LPP UAD, Yogyakarta
- Akrom, 2012. *Gambaran histopatologi jaringan mammae dan prosentase jumlah monosit serta netrofil darah tepi pada tikus SD yang diinduksi DMBA setelah mendapatkan MBJH*, Laporan penelitian Mandiri, LPP UAD, Yogyakarta
- Almatsier, S., 2005. *Prinsip Dasar Ilmu Gizi*. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Angraeni, D., 2007. *Mewaspadaai Adanya Sindrom Metabolic*. (Online). (<http://labcito.co.id>., diakses 24 Desember 2008]

- Anwar, T., 2004. Faktor risiko penyakit jantung koroner. Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara. (online) (<http://library.usu.ac.id/download/fk/gizi-bahri10.pdf>, Diakses 1 Januari 2009)
- Arambepola, C. et al, 2007. Gender Differential of Abdominal Obesity Among the Adults in the District of Colombo, Sri Lanka. *Preventive Medicine* 44 (2007) 129-134. (online, [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com) Diakses 18 Desember 2006)
- Arief, I. 2008. mencegah obesitas dengan mengurangi waktu nonton tv. artikel.(online) ([www.pjnhk.go.id/view/808/31](http://www.pjnhk.go.id/view/808/31), diakses 1 Januari 2009)
- Armstrong, D., Gadoth, N., Goebel, H.H., 2011. *Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice: Oxidative Stress and Free Radical Damage in Neurology*, HUMANA Pres, Springer New York Dordrecht Heidelberg London
- Arnelia. 2002. Fitokimia, Komponen Ajaib Cegah PJK, Diabetes Mellitus & Kanker. <http://www.kimianet.lipi.go.id/utama.cgi?artikel>.
- Awad, E.M., 2005. In vitro decreases of the fibrinolytic potential of cultured human fibrosarcoma cell line, HT1080, by *Nigella sativa* oil., *Phytomedicine*, 12(1-2):100-7
- Badary OA, Abd-Ellah MF, El-Mahdy MA, Salama SA, Hamada FM, 2007. Anticlastogenic activity of thymoquinone against benzo(a)pyrene in mice, *Food Chem Toxicol*, 45(1):88-92
- Badary OA, Al-Shabanah OA, Nagi MN, Al-Rikabi AC, Elmazar MM, 1999. Inhibition of benzo(a)pyrene-induced forestomach carcinogenesis in mice by thymoquinone, *Eur J Cancer Prev.*,8(5):435-40
- Badary OA, Gamal El-Din AM, 2001. Inhibitory effects of thymoquinone against 20-methylcholanthrene-induced fibrosarcoma tumorigenesis., *Cancer Detect Prev.*,25(4):362-8

- Bajak, E.Z., 2005. Genotoxic stress: novel biomarkers and detection methods uncovering RNAs role in epigenetics of carcinogenesis, Dissertation, Karolinska University Press, Sweden
- Baratawidjaja, K.G. 2004. *Imunologi Dasar*. Jakarta : Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- Barnwal, P., Vafa, A., Afzal, S., Shahid, A., Hasan, S., Alpashree, & Sultana, S. (2017). Benzo(a)pyrene induces lung toxicity and inflammation in mice: prevention by carvacrol. *Human & Experimental Toxicology*, 37(7), 752–761. doi:10.1177/0960327117735572
- Bender DA. Free Radicals an Antioxidant Nutrients. In: Murray K, Bender DA, Botham KM, et al. Eds. *Harper's Illustrated Biochemistry*, Ed 28 th Mc Graw Hill Lange 2009;482 – 86
- BPS. 2005. Laporan Hasil Susenas 2004
- Bray, GE., Ryan, DH. 2006. *Overweight and The Methabolic Syndrome: from Bench to Bedside*. Springer Science.
- Burits M and Bucar F, 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother Res*; 14 (5): 323-8
- Ceriello A, Motz E. Is Oxidative Stress the Pathogenic Mechanism Underlying Insulin Resistance, Diabetes and CVD?, *Arterioscler Thromb Vac Bio* 2004 ; 24 : 816-823.1
- Corthay, A., 2009. How do Regulatory T Cells Work?, *Scandinavian Journal of Immunology* 70, 326–336
- Curiel, T.J., 2007. Tregs and rethinking cancer immunotherapy, *J. Clin. Invest.*, 117(5): 1157-74
- Deliver, P.J. and Roit, I.M., 2000. The immune system, *NEJM*, 343(2): 108-17

- Denardo, D.G. and Coussens, L.M., 2007. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression, *Breast Cancer Res.*, 9: 212
- El Aziz, M. A., Hassan, H. A., Mohammed, M.H., Meki, A. R., 2005. The Biochemical and morphological alterations following administration of melatonin, retinoic acid and *Nigella sativa* in mammary carcinoma: an animal model, *int. J. Exp Pathol*, Dec, 86(6):383-96
- El Gazzar M, El Mezayen R, Marecki JC, Nicolls MR, Canastar A, Dreskin SC., 2006. Anti-inflammatory effect of thymoquinone in a mouse model of allergic lung inflammation. *Int Immunopharmacol*, 6(7): 1135-42
- El Gazzar M, El Mezayen R, Nicolls MR, Marecki JC, Dreskin SC, 2006. Downregulation of leukotriene biosynthesis by thymoquinone attenuates airway inflammation in a mouse model of allergic asthma. *Biochim Biophys Acta*, 1760(7):1088-95
- El Sayed, I., and Fukushima S., 2003. Chemopreventive potential of volatile oil from black cumin (*Nigella sativa* L) seeds against rat colon carcinogenesis. *J. of Nutrit and Cancer*. 45 (2):195-202
- 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., *J Ethnopharmacol.*, 72(1-2): 299-304
- El-Mahdy MA, Zhu Q, Wang QE, Wani G, Wani AA., 2005. Thymoquinone induces apoptosis through activation of caspase-8 and mitochondrial events in p53-null myeloblastic leukemia HL-60 cells., *Int J Cancer*, 117(3): 409-17.
- El-Rayes, B.F., Ali, S., Heilbrun, L.K., Lababidi, S., Bouwman, D., Vischer, D., Philip, P.A., 2003. Cytochrome P450 and Glutathione Transferase Expression in human breast cancer, *Clinical Cancer research*, 9:1705-09

- Farah, I.O., and Begum, R.A., 2003. Effect of *Nigella sativa* (*N. sativa* L.) and oxidative stress on the survival pattern of MCF-7 breast cancer cells., *Biomed Sci Instrum*, 39:359-64
- Fararh, K.M., Atoji Y, Shimizu Y, Shiina T, Nikami H, Takewaki T, 2004. Mechanisms of the hypoglycaemic and immunopotentiating effects of *Nigella sativa* L., oil in streptozotocin-induced diabetic hamsters, *Res Vet Sci*, 77(2):123-9
- Fehervari, Z. and Sakaguchi, S., 2004. CD4Tregs and Immune control, *J.Clin Invest*, 114 (9):1209-17
- Fonseca, V., 2008. *Therapeutic Strategies MS*, Clinical Publishing Oxford, Oxford Centre for Innovation Mill Street, Oxford OX2 0JX, UK
- Fouda, AM, Daba MH, Dahab GM, Sharaf El-Din OA, 2008. Thymoquinone ameliorates renal oxidative damage and proliferative response induced by mercuric chloride in rats., *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 103(2):109-18
- Gali-Muhtasib H, Roessner A, Schneider-Stock R, 2006. Thymoquinone: a promising anti-cancer drug from natural sources, *Int J Biochem Cell Biol.*, 38(8):1249-53
- Gali-Muhtasib, H., Diab-Assaf, M., Boltze, C., Al-Hmaira, J., Hartig, R., Roessner, A., Schneider-Stock, R., 2004. Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cells via a p53-dependent mechanism, *Int J Oncol.*, 25(4):857-66
- Gali-Muhtasib, H., Kuester, D., Mawrin, C., Bajbouj, K., Diestel, A., Ocker, M., Habold, C., Foltzer-Jourdainne, C., Schoenfeld, P., Peters, B., Diab-Assaf, M., Pommrich, U., Itani, W., Lippert, H., Roessner, A., Schneider-Stock, R., 2008. Thymoquinone triggers inactivation of the stress response pathway sensor



- CHEK1 and contributes to apoptosis in colorectal cancer cells, *Cancer Res.*;68(14): 5609-18
- Gao, J., Mitchell, L.A., Lauer, F.T., Burchiel, S.W., 2008. p53 and ATM/ATR Regulate 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene-Induced Immunosuppression, *Molecular Pharmacology*, Vol. 73, No. 1
- Granot, E., Kohen, R., 2004. Oxidative stress in childhood: In health and disease states, *Clin Nutr*, 23,3,11
- Grune, T., 2005. *Free Radicals and Diseases: Gene Expression, Cellular Metabolism and Pathophysiology*, IOS Press, Amsterdam • Berlin • Oxford • Tokyo • Washington, DC
- Gu, Q., Hu, C., Chen, Q., Xia, Y., Feng, J., & Yang, H. (2009). Development of a rat model by 3,4-benzopyrene intra-pulmonary injection and evaluation of the effect of green tea drinking on p53 and bcl-2 expression in lung carcinoma. *Cancer Detection and Prevention*, 32(5-6), 444–451. doi:10.1016/j.canep.2009.04.002
- Gu, D., Reynolds K, Wu X, Chen J, Duan X, Reynolds RF, Whelton PK, He J, 2005. Prevalence of The Metabolic Syndrome and Overweight Among Adults in China. *Lancet* 365:1398–1405
- Gurung, R.L., Lim, S.N., Khaw, A.K., Soon, J.F.F., 2010. Induces Telomere Shortening, DNA Damage and Apoptosis in Human Glioblastoma Cells, *Cells*. *PLoS ONE* 5(8): e12124. doi:10.1371/journal.pone.0012124
- Hadju, V., 2003. *Bahan Bacaan Mata Kuliah Dietetik Masyarakat*. Makassar. Jurusan Gizi FKM Unhas.
- Haq, A., Lobo, P.I., Al Tufail, M., Rama, N., R., Al Sedairy, S., T., 1999. Immunomodulatory effect of *Nigella sativa* proteins fractionated by ion exchange chromatography, *Int. J. Immunopharmacol.*, 21(4):283-95
- Harjanto. 2003. *Antioksidan Functions as A Network: Cooperation and Interdependence*.

- Hayens, B., et al, 2003. Buku Pintar Menaklukkan Hipertensi. Jakarta: Ladangpustaka & Intimedia.
- Hernani, Rahardjo M. 2005. Tanaman Berkhasiat Antioksidan. Jakarta: Penebar Swadaya
- Hidayati, T. dan Akrom, 2009. The effect of Nigella Sativa seed extract on the reactive oxygen intermediates (ROI) secretion and phagocytosis activity by macrophages in DMBA-induced female SD rat, Seminar internasional, Yogyakarta, 17-18 januari 2009
- Hidayati, T.and Akrom, 2006. Pengaruh ekstrak etanol jintan hitam terhadap aktivitas fagositosis makrofag mencit Swiss yang diinfeksi P.berghei secara in vitro, prosiding seminar nasional farmakoterapi, Program Profesi Apoteker Fakultas Farmasi UAD, Yogyakarta : 14 Januari 2006
- Hong, C.-H., Lee, C.-H., Yu, H.-S., & Huang, S.-K. (2016). Benzopyrene, a major polyaromatic hydrocarbon in smoke fume, mobilizes Langerhans cells and polarizes Th2/17 responses in epicutaneous protein sensitization through the aryl hydrocarbon receptor. *International Immunopharmacology*, 36, 111–117. doi:10.1016/j.intimp.2016.04.017
- Ibrahim,R.M., Hamdan, N.S., Ismail1, M., Saini, S.M., Rashid, S.N.A., Latiff, L.A., Mahmud, R., 2013. Protective Effects of Nigella sativa on Metabolic Syndrome in Menopausal Women, *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2014, x(x), xxx-xxx
- Iddalmadeniya, S.S., Thabrew, M.L., Wickramasinghe, S.M.D.N., Ratnatunge, N., Thammitiyagodage, M.G., 2006. A long-term investigation of the anti-hepatocarcinogenic potential of an indigenous medicine comprised of Nigella sativa, Hemidesmus indicus and Smilax gabra, *J. Carcinog*, 8(1):6

- Iddalmadeniya, S.S., Thabrew, M.L., Wickramasinghe, S.M.D.N., Ratnatunge, N., Thammitiyagodage, M.G., 2003. Protections against diethylnitrosoamine-induced hepatocarcinogenic by an indigenous medicine comprised of *Nigella sativa*, *Hemidesmus indicus* and *Smilax gabra*, *J. Carcinog*, 2(1):6
- IDF. 2005. The IDF Concensus Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome.(online) ([www.idf.org](http://www.idf.org), diakses 20 Januari, 2009)
- Inoue, S. Zimmet P. Caterson I. 2000. The Asia Pasific Perspective: Redefining Obesity and Its Treatment. Health Communication. Australia.
- Isomaa B et al. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 2001;24:683-689.
- Jia, WP. KS Xiang, L. Chen, JX Lu, YM. Wu. Epidemiological Study on Obesity and Its Comorbidities in Urban Chinese Older than 20 Years of Age in Shanghai China. *Obesity Reviews*, 2002 ; 3:157-165
- Jiang, H. and Chess, L., 2004. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation, *J.Clin. Invest.*, 114(9):1198-208
- Joseph, N.M., Monica, S., Alok, M and Shruti, R., 2010, In Vitro And In-Vivo Models For Antioxidant Activity Evaluation: A Review *IJPSR*, 1,1,1-11
- Kaplan, N.M. Smoking and hypertension. 2009 (online) ([www.patient/autor/content.do?topickey=hiperten5360](http://www.patient/autor/content.do?topickey=hiperten5360) diakses 6 November 2009).
- Khan R, Buse J, Ferrannini E, Stern M. The metabolic Syndrome: Time for a Critical Appraisal: Join Statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 2005; 28: 2289-2304

- Khan, N., Sharma, S., Sultana, S., 2003. Nigella sativa (black seed) ameliorates potassium bromated-induced early events of carcinogenesis: diminution of oxidative stress, Human & Experimental Toxicology, 22:193-203
- Kim, B.J et al. Association of Smoking status, Weight Changes, and incident Metabolic syndrome in Men : A 3-Year Follow-Up Study. Diabetes care, 2007 (32:7)
- Kim, D.M. et al. National Prevalence of Obesity: Prevalence of Obesity in Korea. Obesity Review (2005) 6, 117-121.
- Kresno, S.B., 2001. Imunologi : Dignosis dan Prosedur Laboratorium. Ed. Keempat. Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- Kumalaningsih Sri. 2006. Antioksidan Alami Penangkal Radikal Bebas Sumber ,Manfaat, cara penyediaan dan pengolahan. Trubus Agrisarana. Surabaya
- Kumar, S., 2011, Free Radicals and Antioxidants: Human and Food System, Adv,Appl,Sci.Res.,2,1,129-135.
- Kusmana, D., 2007. Rokok & kesehatan jantung. (online) (<http://www.kardiologi-ui.com/newsread.php?id=312> , diakses 29 Desember 2008)
- Leong LP dan Shui G, 2002. An Investigation of Antioxidant Capacity of Fruits in Singapore Markets, Food Chemistry ,76: 69–75
- Lipoeto, N., 2002. Consumption of Minangkabau Traditional Food and Cardiovascular Disease in west sumatra, indonesia. Monash university
- Mabrouk, G.M., Moselhy, S.S., Zohny, S.F., Ali, E.M., Helal, T.E., Amin, A.A., Khalifa, A.A., 2002. Inhibition of methylNitrosourea (MNU) induced oxidative stress and carcinogenesis by orally

- administered bee honey and *Nigella* grains in Sprague Dawely rats., *J Exp Clin Cancer Res.*,21(3):341-46
- Majalah Farmacia, 2007. Stress Oksidatif, Faktor Penting Penyulit Vascular. (online)( [www.combiphar.com/ahp](http://www.combiphar.com/ahp), diakses 2 Januari, 2009)
- Majalah Ilmu Faal Indonesia. 3(1): 40-46
- Mansour, M.A., Ginawi, O.T., El-Hadiyah, T., El-Khatib, A.S., Al-Shabanah, O.A., Al-Sawaf, H.A., 2001. Effects of volatile oil constituents of *Nigella sativa* on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice: evidence for antioxidant effects of thymoquinone., *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.*,110(3-4): 239-51
- Marquezzine G., F, Oliveira CM, Pereira AC, Krieger JE, Mill JG, 2008 Metabolic Syndrome Determinants in An Urban Population from Brazil: Social Class and Gender-Specific Interaction. *Int J Cardiol* 129:259–265
- Mashhadian, N.V., & Rakhshandeh, H., 2005, Antibacterial and antifungal effects of *N.sativa* Extracts against *S. aureus*, *P. araginososa* and *C. albicans*, *Pak J Med Sci*, 21:147-52
- Massadeh, A.M., Al-Safi, S.A., Momani, I.F., Al-Mahmoud, M., Alkofahi, A.S., 2007. Analysis of cadmium and lead in mice organs: effect of *Nigella sativa* L. (Black Cumin) on the distribution and immunosuppressive effect of cadmium-lead mixture in mice., *Biol Trace Elem Res*, 115(2):157-67
- Mbarek, L.A., H. Ait Mouse, H.I., Elabbadi, Bensalah,M., Gamouh, A., Aboufatima, R., Benharref, A., Chait, A., M. Kamal, M., Dalal,A., and Zyad,A.,2007. Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts, *Braz J Med Biol Res*, 40(6):839-47

- Meiyanto<sup>a</sup>, E., Sugiyanto, and R. Murwanti. 2004. Efek Anti Karsinogenesis Ekstrak Etanol Tanaman Daun Dewa (*Gynura procumbens* (Lour) Merr) pada kanker Payudara Tikus yang diinduksi dengan Dimetilbenz(a)antrazena (DMBA). Penelitian Hibah Bersaing, 6-12
- Meiyanto<sup>b</sup>, E., Susilowati, Sitarina, Arifin, I., 2004, Efek Antimutagenik ekstrak etanolik daun *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. Pada kanker payudara tikus terinduksi DMBA melalui induksi enzim GST hepar dalam seminar “Perhimpunan Biokimia dan Biologi Molekuler Indonesia” Yogyakarta
- Misra A, Sharma R, Pandey RM, Khanna N., 2001. Adverse Profile of Dietary Nutrients, Anthropometry and Lipids in Urban Slum Dwellers of Northern India. *Eur J Clin Nutr* 55:727–734.
- Misra, A. and Khurana, L., 2008. Obesity and the metabolik syndrome in developing countries. *J Clin Endocrinol Metab*, November 2008, 93(11):S9–S30. (online) ( <http://jcem.endojournals.org>, diakses 14 April 2009).
- Misra, A., et al., 2001. High Prevalence of Diabetes, Obesity and Dyslipidaemia in Urban Slum Population in Northern India. *International Journal of Obesity*. Nov.2001. Vol 25, No.11:1722-1729.
- Mohtashami, R., Amini, M., Huseini, F.H., Ghamarchehre, M., Sadeqhi, Z., Hajiagaee, R., Huseini, F.A., 2011. Blood Glucose Lowering Effects of *Nigella Sativa* L. Seeds Oil in Healthy Volunteers: a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial, *Journal of Medicinal Plants*, Volume 10, No. 39,
- Mousa, D., Dilsiz, N., Gumushan, H., 2004. Antitumor activity of an ethanol extract of *Nigella sativa* seeds, *Biologia-Bratislava*, 59(6):735-40

- Mulyasih, A.B., and Akrom, 2009. The Effect Chemoprevention of the ethanolic extract seed *Nigella sativa* L. IN DMBA – induced female Sprague Dawley rat and thin layer chromatography profile, seminar internasional, Yogyakarta, 17-18 Januari 2009
- Musa, D., Dilsiz, N., Gumushan, H., 2004. Antitumor activity of an ethanol extract of *Nigella sativa* seeds, *Biologia-Bratislava*, 59(6):735-40
- Najmi, A, Nasiruddin, M., Khan, R.A., Haque, S.F., 2012. Therapeutic effect of NS (*Nigella sativa*) in patients of poor glycemic control, *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* Vol 5, Suppl 3, 2012
- Najmi, A., Nasiruddin, M., Khan, R.A., Haque, S.F., 2013. Indigenous Herbal Product *Nigella Sativa* Proved Effective As An Antihypertensive In Metabolic Syndrome, *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* Vol 6, Issue 1,
- Nelson, B.H., 2004. IL-2, Regulatory T Cells, and Tolerance, *The J.Immunol.*, 172: 3983–3988.
- NHLBI. 1998. Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults: The Evidence Report. (Online), ([www.nhlbi.nih.gov/guidelines/obesity/ob\\_gdlns.htm](http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/obesity/ob_gdlns.htm), diakses Desember 2008)
- Nickavar, B., Mojab, F., Javidnia, K., Amoli, M., A., 2003. chemical composition of the fixed and volatile oils of *Nigella sativa* L. from Iran, *J. Naturforsch.*, 58(9-10): 629-31
- Oneyka. C., Aligwekwe, A., Nwakanma, A., Bakare. A., Ofeoge, U. 2012. Effect of Ethanolic Root Bark Extract of *Chrysophyllum albidum* on Serum SOD, Catalase, and MDA in rats. *International journal of Pharmacology science and research*, 3(3):345-351

- Parhizkar, S., Latiff<sup>1</sup>, L.A., Rahman, S.A., Dollah, M.A., 2011, Preventive effect of *Nigella sativa* on metabolic syndrome in menopause induced rats, *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 5(8), pp. 1478-1484
- Parhizkar, S., Latiff, L.A., Rahman, S.A., Hanachi, P., Dollah, M.A., 2011. Metabolic Impact of *Nigella sativa* extracts on Experimental Menopause Induced Rats, *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 01 (09); 38-42
- Parslow, T.G., Stites, D.P., Terr, A.I., Imboden, J.B., 2003. *Med. Immunol.*, tenth edition, Boston
- PDPI, 2003. Kanker paru pedoman diagnosis dan penatalaksanaan di Indonesia, Perhimpunan Dokter Paru Indonesia, Jakarta, Indonesia
- Pitsavos, C. et al, 2006. Diet, Exercise and Metabolic Syndrome. The Review of Diabetic Studies: DOI 10.1900/RDS.2006.3.118 (online), ([www. The-RDS.org](http://www.The-RDS.org), dikases 10 Desember 2008)
- Raji A, Seely EW, Arky RA, Simonson DC, 2001. Body Fat Distribution and Insulin Resistance in Healthy Asian Indians and Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5366–5371
- Randhawa, M.A., and Al-Ghamdi, M.S., 2002, A review of the pharmaco-therapeutic effects of *Nigella sativa*, *Pakistan J.Med. Res.*, 41: 2
- Sangat, H.M., Zuhud, E.A.M., dan Damayanti, E.K., 2000. *Kamus Penyakit dan Tumbuhan Obat Indonesia*. Jakarta : Yayasan Obor Indonesia
- Sartika, Cyntia R. 2006. Penanda Inflamasi, Stress Oksidatif dan Disfungsi Endotel pada Sindroma Metabolik. *Forum Diagnosticum. Prodia Diagnostics Educational Services*. No. 2.



- Shah, A., Khan, G.M., Badshah, A., Shah,S.U., Shah, K.U., Mirza, S.A., 2012. *Nigella sativa* provides protection against metabolic syndrome African Journal of Biotechnology Vol. 11(48), pp. 10919-10925,
- Shahab, A. 2007. Sindrom Metabolik. Media informasi Ilmu Kesehatan dan Kedokteran. (online), ([http:// alwia.com](http://alwia.com), diakses 24 Januari 2009)
- Shahzad F. Haque , M. Nasiruddin, A. Najmi, 2011. Indigenous herbal product *Nigella sativa* proved effective as an Anti-obesity therapy in metabolic syndrome, *Int J Med Res.* ; 1(3):173-176
- Sehgal, A., Kumar, M., Jain, M., & Dhawan, D. K. (2011). Synergistic effects of piperine and curcumin in modulating benzo(a)pyrene induced redox imbalance in mice lungs. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 22(1), 74–80. doi:10.3109/15376516.2011.603392
- Soeharto, I. , 2004. Penyakit Jantung Koroner dan Serangan Jantung. Jakarta: Gramedia..
- Soskic, SS., Dobutivic, BD., Sudar, EM. Et .al Regulation of inducible nitric oxide (iNOs and its potential role in insulin resistance diabetes and heart failure. *Open Cardiovasc Med J.* 2011.5 : 153-163.
- Stein B, Eschenhagen T, Rudiger J. 2008. Increased expression of constitutive nitric oxide synthase III, but not inducible nitric oxide synthase II, in human heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 32:1179 –1186.
- Stelmach et al. How income and education contribute to risk factors for cardiovascular diseases in elderly in a former communist country. *Public Health* (2004) 118, 439-449.
- Stibich, M., 2007. Age and High Blood Pressure. (online), ([www. Medical Review Board about.com](http://www.MedicalReviewBoard.about.com), diakses 3 November, 2009)

- Stocker R, Keaney JF. Role of Oxidative Modification in Atherosclerosis, *Physiol Rev*, 2004 ; 84 : 1381-1478.
- Suhardjo. 1989. *Sosio Budaya Gizi Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi*. IPB Bogor.
- Suyono, A, 2001. Serat Benteng Terhadap Aneka Penyakit. (online), (<http://www.suyono.wordpress.com>, diakses 29 September 2008)
- Targher, G., dkk., 1999. Cigarette Smoking and Insulin Resistance in Patients with Noninsulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Journal of clinical Endocrinology and metabolism*. (online), ([www.jcem.endojournals.org](http://www.jcem.endojournals.org), diakses 22 Februari 2009)
- Tjokprawiro A. 2006. New Approach in The Treatment of T2DM and Metabolic Syndrome. *The Indonesian Journal of Internal Medicine*. 38:160-166.
- Tomasi, A., Ozben, T., Skulachev, V.P., 2003. *Free radicals, NO, And Inflammation: Molecular biochemical And clinical aspect*, /OS Press, Amsterdam • Berlin • Oxford • Tokyo • Washington, DC
- Van der veen, R.C., 2001. Nitric oxide and T helper cell immunity, *International immunopharmacology*, 1, 1491-500
- Winarsi H, 2007. *Antioksidan alami dan radikal bebas , aknisius , Yogyakarta*
- Winarsih H ,2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas (Potensi dan Aplikasinya dalam Kesehatan)*. Kanisius. Yogyakarta
- Yi, T., Yi, Z., Pang, X., Rodriguez, M., Wang, Y., Sethi, G., Aggarwal, B.B., Liu, M., 2008. Thymoquinone inhibits tumor angiogenesis and tumor growth through suppressing AKT and ERK signaling pathways, *Mol Cancer Ther*. 2008 July ; 7(7): 1789–1796. doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0124

Zhang, N., Wang,X., Mao, S., Zhao, F., 2011. Astragaloside IV Improves Metabolic Syndrome and Endothelium Dysfunction in Fructose-Fed Rats, *Molecules*, 16, 3896-39

## DAFTAR RIWAYAT HIDUP PENULIS



### **Dr. dr. Akrom, M.Kes**

Penulis menempuh Pendidikan di SMA negeri I kota Pati, Jawa Tengah, Indonesia. Penulis menyelesaikan pendidikan kedokteran dan profesi di fakultas kedokteran UGM. Saat ini menjadi dosen tetap di fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan. Saat ini Penulis menjadi dosen di Fakultas Farmasi UAD dengan mata kuliah utama imunofarmakologi, imunologi, farmasi klinis, evidence based medicine, asuhan kefarmasian, Kesehatan masyarakat dan Farmakoterapi.

Menempuh pendidikan S2 dan S3 di FK UGM dengan spesialisasi kajian pada imunofarmakologi fitokimia, imunomodulator dan antioksidan.

Penulis menekuni penelitian dengan topik imunofarmakologi, imunomodulator fitokimia, kemopreventif, farmakoepidemiologi, farmasi komunitas dan farmasi klinis.

Penulis juga telah menulis beberapa judul buku (lebih dari 6 buku) dan juga telah mempublikasikan hasil-hasil penelitiannya pada beberapa jurnal nasional terakreditasi maupun jurnal internasional bereputasi (lebih dari 50).



**Dr. dr. Titiek Hidayati M. Kes. Sp. DLP.,Sp. KKLP. FISPH.,FISCM.**

Penulis setelah menyelesaikan pendidikan di SMA Negeri I kotamadya Yogyakarta, kemudian menyelesaikan pendidikan kedokteran dan profesi di Fakultas Kedokteran UGM. Saat ini menjadi dosen tetap di prodi kedokteran fakultas kedokteran dan ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

Penulis telah menempuh pendidikan S2 Field Epidemiology Training Program (FETP) dan S3 di Fakultas Kedokteran UGM dengan spesialisasi di bidang Epidemiologi, public genomik, pencegahan, kedokteran keluarga dan masyarakat. Penulis pernah mendapatkan beasiswa *Sandwich-Like* DIKTI untuk Mahasiswa S3 (PKPI) di National Cheng Kung University/ NCKU, Taiwan, departemen epidemiologi molekuler.

Penulis juga merupakan lulusan Program studi Pendidikan spesialis/ PPDS DLP/ dokter layanan primer, fakultas kedokteran Universitas Padjajaran/UNPAD di Bandung. Penulis menekuni penelitian dengan topik epidemiologi, public genomik, kedokteran pencegahan, kedokteran keluarga dan masyarakat, imunomodulator herbal, kemopreventif.

Selain buku ini, penulis juga telah menulis beberapa judul buku dan telah mempublikasikan hasil-hasil penelitiannya pada beberapa jurnal nasional terakreditasi maupun jurnal internasional bereputasi.



### **Dr.apr. Arif Budi Setianto, M.Si.**

Penulis telah menyelesaikan Pendidikan S1, profesi dan S2 di Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada. Sedangkan Pendidikan S3 diselesaikan di Institut Teknologi Bandung. Saat ini Penulis menjadi dosen di bagian Teknologi Farmasi Fakultas Farmasi UAD. Mata kuliah dan topik penelitian Penulis adalah berkaitan dengan teknologi farmasi.