

BAB 6

PEMBAHASAN

Semua prosedur penelitian yang diintervensikan terhadap hewan coba sudah dinyatakan laik etik oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan FKUB pada tanggal 14 Maret 2014 dengan No. 194 / EC / KEPK – S1 – FARM / 03 / 2014 yang dapat dilihat pada Lampiran 16.

6.1 Ekstraksi Biji Jintan Hitam

Hasil ekstraksi biji jintan hitam menggunakan 300 gram simplisia dengan metode maserasi dan pelarut etanol 80% didapatkan ekstrak kental sejumlah 55,14 gram yang terpisah dalam 2 fase (minyak dan solid) dengan proporsi fase minyak lebih sedikit dari fase solid. Sedangkan pada penelitian rujukan yang dilakukan oleh Ali Benhaddou-Andaloussi (2011), didapatkan ekstrak dengan proporsi 70% fase minyak dan 30% fase solid. Adanya perbedaan hasil ini dapat diakibatkan oleh perbandingan jumlah simplisia dan pelarut, serta waktu yang dibutuhkan untuk memekatkan ekstrak.

Pada jurnal rujukan, tidak disebutkan secara pasti perbandingan antara jumlah simplisia dan pelarut serta waktu pemekatan ekstrak, sehingga dalam penelitian ini dilakukan optimasi untuk mendapatkannya. Dengan perbandingan 1:5 antara simplisia dan pelarut didapatkan ekstrak yang tidak memisah antara fase minyak dan solid, maka dari itu pada penelitian kali ini digunakan perbandingan 1:3. Selain itu pada penelitian ini dilakukan 2 kali pemekatan ekstrak menggunakan *rotary evaporator* selama 3 jam dan oven vakum selama 12 jam, waktu yang dibutuhkan untuk memekatkan ekstrak tergantung dari konsistensi ekstrak yang didapatkan.

Berdasarkan jurnal yang ditulis oleh Gurganova and Wawrzyniak (2012), untuk mengekstrak minyak atsiri yang terkandung dalam *essential oil* biji jintan hitam dibutuhkan jenis pelarut organik seperti air, alkohol, eter, kloroform maupun benzen. Zat aktif *thymoquinone* memiliki karakteristik kelarutan yang rendah dalam air, sehingga pada penelitian ini dipilih pelarut etanol dengan pertimbangan metode pemberian terapi pada tikus yang akan diberikan secara *intra gastric* (sonde), sehingga dibutuhkan pelarut organik yang relatif aman (Sethi, 2003; Janan *et al.*, 2013).

6.2 Uji Fitokimia Ekstrak Biji Jintan Hitam

Uji fitokimia dilakukan untuk memastikan keberadaan zat yang terkandung dalam biji jintan hitam. Berdasarkan jurnal yang ditulis oleh Tembhrne *et al.* (2014) biji jintan hitam mengandung *fixed oil*, alkaloid, saponin dan *essential oil*. Selain itu dilakukan uji minyak atsiri karena *thymoquinone* yang merupakan zat aktif yang berperan sebagai agen antidiabetes dan antioksidan termasuk dalam golongan minyak atsiri.

6.2.1 Uji Alkaloid

Keberadaan metabolit sekunder alkaloid pada ekstrak biji jintan hitam diuji menggunakan reaksi pengendapan menggunakan 2 macam reagen yaitu dengan penambahan reagen Mayer dan reagen Wagner. Digunakan 2 larutan pereaksi dalam uji ini karena berdasarkan Materia Medika Indonesia V, ekstrak dapat dikatakan mengandung alkaloid jika sekurang-kurangnya terbentuk endapan dengan menggunakan 2 golongan larutan pereaksi.

Prinsip pengujian menggunakan pereaksi Mayer adalah bila ekstrak yang diuji mengandung alkaloid maka akan terbentuk senyawa adisi yang tidak larut (endapan) berwarna putih. Sedangkan prinsip pengujian menggunakan pereaksi Wagner adalah terbentuknya senyawa kompleks bebas yang mengendap berwarna kecoklatan. Pada pengujian ekstrak biji jantan hitam dengan kedua pereaksi tersebut, didapatkan hasil yang positif (Lampiran 13). Sehingga dapat disimpulkan ekstrak biji jantan hitam mengandung alkaloid.

6.2.2 Uji Saponin

Pada uji saponin timbulnya busa menunjukkan adanya glikosida yang memiliki kemampuan membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya (Marliana *et al.*, 2005). Pada penelitian ini terbentuk busa yang stabil selama 10 menit akan tetapi tingginya kurang dari 1 cm, dan pada penambahan 1 tetes HCl buih tidak hilang (Lampiran 13). Dalam hal ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak kemungkinan mengandung saponin karena buih yang terbentuk konsisten dan tidak hilang setelah penambahan asam klorida. Hanya saja jumlahnya sangat sedikit karena tingginya kurang dari 1 cm.

6.2.3 Uji Minyak Atsiri

Pada penelitian ini *thymoquinone* merupakan zat aktif yang berperan sebagai agen antidiabetes dan antioksidan (Ahmad *et al.*, 2013). Senyawa ini tergolong dalam jenis minyak atsiri sehingga perlu dilakukan uji minyak atsiri menggunakan pereaksi Sudan III. Hasil uji minyak atsiri ekstrak biji jantan hitam didapatkan hasil yang positif dimana ekstrak yang berwarna kuning kecoklatan

berubah menjadi warna merah setelah penambahan Sudan III (Lampiran 13). Dari hasil uji ini dapat disimpulkan kemungkinan adanya *thymoquinone* dalam ekstrak etanol biji jintan hitam, akan tetapi untuk memastikannya perlu dilakukan uji menggunakan standar *thymoquinone* dengan kromatografi lapis tipis (KLT) atau dengan GC-MS. Pada penelitian kali ini kedua metode tersebut tidak dapat dilakukan karena keterbatasan bahan dan waktu, selain itu karakteristik pelarut yang digunakan oleh peneliti kurang sesuai dengan karakteristik kolom pada instrumen GC-MS.

6.3 Induksi DM Tipe 2

Induksi DM tipe 2 yang digunakan dalam penelitian ini diadaptasi dari penelitian Wang *et al.* (2007) yang menggunakan kombinasi antara STZ dosis rendah dan induksi pakan tinggi kalori. Induksi pakan tinggi kalori yang diberikan selama 2 bulan bertujuan untuk mencapai kondisi hiperglikemia ringan yang ditandai dengan nilai glukosa darah 117-144 mg/dL (6,5-8 mmol/L) (Gauguier *et al.*, 1991), sedangkan pemberian STZ dosis rendah (30 mg/kgBB) secara *intra peritoneal* (i.p) bertujuan untuk mencapai kondisi disfungsi sel beta pankreas parsial.

Pada penelitian ini induksi DM tipe 2 dibagi dalam 2 tahap. Tahap pertama, tikus diberikan pakan tinggi kalori saja selama 8 minggu. Tahap kedua induksi pakan dilanjutkan hingga 4 minggu berikutnya (minggu ke-12) disertai satu kali injeksi STZ dosis rendah (30 mg/kgBB) secara i.p. Kemudian setiap bulan dilakukan pengukuran parameter biokimia yaitu GDP (setiap 2 minggu) dan BB (setiap 4 minggu). Dilakukan penambahan waktu induksi pakan selama 4 minggu karena dalam penelitian ini tidak dilakukan pengukuran parameter

biokimia lain seperti trigliserida (TG), kolesterol total (*total cholesterol*/TC) dan *low density lipoprotein* (LDL) untuk memastikan adanya kondisi hiperglikemia ringan seperti yang dilakukan pada jurnal rujukan. Sehingga diharapkan dengan pemberian pakan tinggi kalori dengan waktu yang lebih lama dapat mencapai kondisi hiperglikemia ringan dilihat dari perubahan GDP dan BB.

Setelah 8 minggu induksi pakan, didapatkan nilai rerata GDP tikus pada 3 kelompok (P_p , P_2 , dan P_3) mengalami kenaikan bila dibandingkan nilai GDP awal, hanya saja kenaikannya masih berada pada rentang normal karena berdasarkan penelitian Handayani *et al.* (2009), kadar GDP normal tikus adalah 100 mg/dL. Sedangkan pada kelompok P_n dan P_1 terjadi penurunan rerata GDP bila dibandingkan awal sebelum induksi, hal ini dapat disebabkan oleh berbagai kondisi fisiologis. Menurut Fox *et al.* (2002) salah satu kondisi fisiologis yang dapat menurunkan kadar glukosa darah adalah tingkat stres pada tikus.

Sedangkan untuk parameter BB (Gambar 5.4), semua kelompok tikus mengalami kenaikan yang cukup tinggi pada minggu ke-4 dan 8 dibandingkan dengan awal sebelum induksi. Hasil ini berbeda dengan penelitian Wang *et al.* (2007) dimana tidak terdapat kenaikan BB yang signifikan setelah pemberian pakan tinggi kalori selama 4 minggu. Hal ini dapat disebabkan karena perbedaan usia tikus yang digunakan dalam penelitian, pada penelitian ini digunakan tikus dengan usia 12 bulan sedangkan pada jurnal rujukan digunakan tikus dengan usia 25 minggu (6 bulan lebih 1 minggu). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Ghezzi *et al.* (2012) tentang marker sindroma metabolik pada tikus Wistar berbagai usia yang diberi pakan normal. Didapatkan adanya peningkatan BB yang signifikan pada tikus usia 12 bulan dibandingkan dengan tikus Wistar usia

2, 4, dan 6 bulan diikuti munculnya tanda-tanda dislipidemia yang terlihat dari adanya peningkatan serum TG, TC serta LDL. Dari penelitian tersebut disimpulkan bahwa penuaan pada tikus menyebabkan adanya gangguan metabolisme dan distribusi lemak, sehingga pemberian pakan tinggi kalori yang memicu peningkatan BB pada penelitian ini dianggap wajar.

Berdasarkan rerata nilai GDP, pada penelitian ini tikus masih belum mencapai kondisi hiperglikemia ringan, hal ini sesuai dengan penelitian Wang *et al.* (2007) yang menunjukkan bahwa sampai minggu ke-4 induksi pakan tinggi kalori memang belum terlihat adanya perubahan yang signifikan pada parameter biokimia, akan tetapi berdasarkan analisis ekspresi gen yang diukur menggunakan *polymerase chain reaction (PCR) real time*, mulai tampak adanya perubahan ekspresi mRNA seperti adiponectin dan leptin yang ikut terlibat dalam metabolisme energi pada jaringan. Akibat dari perubahan modulasi secara molekular ini, metabolisme energi dibawa pada tingkat pengaturan baru yang berdampak pada stabilnya nilai glukosa darah dan beberapa parameter kimia lain seperti TG, TC dan LDL.

Adiponectin merupakan protein yang khusus terekspresi pada jaringan adiposa yang berperan penting dalam regulasi homeostasis energi termasuk glukosa dan lipid serta menjadi marker terjadinya resistensi insulin. Sedangkan leptin merupakan protein yang berfungsi sebagai sinyal aferen dalam jaringan adiposa sebagai umpan balik yang mengatur masa jaringan yang dapat menyebabkan penurunan glukosa darah dan level insulin, leptin juga bekerja pada hipotalamus untuk mengatur ambilan energi (Pittas *et al.*, 2004; Wang *et*

al., 2007). Selain itu rendahnya kadar GDP juga dapat disebabkan karena berkurangnya jumlah asupan makanan yang dikonsumsi oleh tikus (Gambar 5.3).

Tiga hari setelah induksi STZ rerata GDP tikus meningkat drastis. Semua kelompok tikus dinyatakan DM karena nilai GDP ≥ 200 mg/dL. Hal ini disebabkan karena STZ bekerja merusak sel beta pankreas dengan memproduksi ion karbonium (CH_3^+) yang akan mengakibatkan penurunan mekanisme perbaikan sel. Sehingga dengan rusaknya sel beta pankreas maka produksi insulin akan menurun dan mengakibatkan ambilan glukosa ke dalam sel berkurang. Secara otomatis kadar glukosa dalam sirkulasi darah akan meningkat (Sobrevilla *et al.*, 2011). Pemberian pakan tinggi kalori masih diberikan selama masa terapi (minggu ke-8 hingga minggu ke-12) agar hasil terapi yang didapatkan tidak bias.

6.4 Efek Ekstrak Biji Jintan Hitam Terhadap Perbedaan Kadar MDA Antar Kelompok

Berdasarkan uji *One-way* ANOVA dan analisis *Post Hoc* LSD didapatkan perbedaan kadar MDA jantung secara bermakna pada 6 kelompok tikus, yaitu kelompok P_n dengan P_p , kelompok P_p dengan P_1 , dan kelompok P_p dengan P_2 . Kadar MDA kelompok P_p merupakan yang paling tinggi dibandingkan dengan kelompok ekstrak (P_1 , P_2 , P_3) maupun dengan kelompok tween 80 (P_n). Berdasarkan penelitian Rousselot *et al.* (2003) selain efek antihiperqlikemia, metformin dapat meningkatkan status antioksidan pada pasien DM dengan menghambat pembentukan AGEs. Dalam konsentrasi yang relevan, secara *in vitro* metformin dapat menangkap radikal bebas hidroksil ($\bullet\text{OH}$), tetapi tidak pada jenis radikal superoksida ($\bullet\text{O}_2^-$) dan hidrogen peroksida (H_2O_2). Berdasarkan tingkat keparahan DM yang dilihat dari rerata GDP 3 hari setelah injeksi STZ,

kelompok P_p memiliki rerata GDP paling tinggi (Gambar 5.2). Sehingga tingginya kadar MDA pada kelompok P_p kemungkinan diakibatkan oleh 2 faktor yakni kurangnya kemampuan metformin dalam menangkap radikal bebas serta kondisi DM berat yang mengakibatkan stres oksidatif berlebihan dan pembentukan peroksidasi lipid.

Berdasarkan penelitian Ali Benhaddou-Andaloussi tahun 2011 tentang aktivitas antidiabetes jintan hitam secara *in vivo*, dosis yang efektif menurunkan glukosa darah tikus adalah 48 mg/kgBB/hari yang setara dengan 2g jintan/kg/hari, sehingga dosis tersebut menjadi dasar untuk penetapan dosis ekstrak lainnya. Akan tetapi pada penelitian ini, kadar MDA terendah terdapat pada kelompok P₁ sedangkan kelompok P₂ menunjukkan kadar MDA yang lebih besar dibandingkan kelompok P₁ diikuti kenaikan kadar yang lebih tinggi lagi pada kelompok P₃. Kenaikan kadar MDA pada kelompok P₂ dan P₃ diperkirakan bukan diakibatkan toksisitas pada dosis tersebut, karena berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Al-Ali *et al.* (2008) tentang nilai LD₅₀ *thymoquinone* pada tikus dan mencit yang diberikan secara oral maupun i.p didapatkan nilai LD₅₀ tikus pada pemberian secara oral sebesar 794,3 mg/kgBB, sedangkan pada penelitian ini digunakan ekstrak biji jintan hitam yang diduga mengandung *thymoquinone* dan bukan isolat murni zat aktif tersebut.

Meskipun dosis yang dipakai dalam penelitian ini tergolong dosis yang aman karena bukan berasal dari isolat murni *thymoquinone*. Menurut penelitian O'Brien (1992) *thymoquinone* yang merupakan senyawa golongan *quinone* memiliki toksisitas yang dapat timbul dari berbagai macam faktor seperti lingkungan, dan makanan. *Quinone* dapat mengalkilasi protein selular penting

maupun DNA. Selain itu *quinone* merupakan molekul redox yang sangat aktif dan berperan sebagai *redox cycler* menggunakan senyawa *semiquinone* yang menyebabkan terbentuknya ROS seperti superoksida, hidrogen peroksida dan radikal hidroksil yang pada akhirnya akan menyebabkan oksidatif stres berat pada sel dengan membentuk oksidan pada lipid, protein dan DNA. Adanya ROS dapat mengaktivasi beberapa jalur seperti PKC yang akan mempengaruhi produksi oksidan dan AGEs (Bolton *et al.*, 2000; Bandeira *et al.*, 2013).

Sedangkan dilihat dari penurunan rerata GDP minggu ke-8 (Gambar 5.2), kelompok P_n yang hanya mendapatkan larutan pembawa tween 80 memiliki rerata yang lebih rendah dibandingkan 2 kelompok lain yang mendapat terapi (P_p dan P_2), dimungkinkan tikus yang masuk dalam kelompok P_n dari awal perlakuan memiliki fase kompensasi tubuh yang lebih tinggi dibandingkan kelompok lain. Hal ini merupakan salah satu kelemahan yang tidak dapat dikontrol oleh peneliti karena berasal dari subyek penelitian. Peneliti sudah melakukan usaha untuk meminimalisasi faktor perancu dengan memberikan kriteria inklusi pada hewan coba berupa jenis kelamin, berat badan, umur, galur dan fisik yang sehat.

Selain itu ada beberapa hal yang dapat mengakibatkan perbedaan hasil pengukuran kadar MDA, salah satunya dapat disebabkan oleh masih adanya darah dalam jaringan. Jantung merupakan organ yang kaya akan darah karena fungsinya yang menjadi pompa darah ke seluruh jaringan tubuh. Darah kaya akan ion besi yang dapat menjadi katalisator dalam proses pembentukan peroksidasi lipid sehingga dapat menyebabkan peningkatan kadar MDA (Schafer *et al.*, 2000). Oleh sebab itu, dalam pengukuran MDA darah harus benar-benar dihilangkan dari organ jantung. Adanya kendala dalam proses pembuatan isolat

jaringan jantung akibat karakteristik jaringan yang sulit hancur serta instrumen yang digunakan dapat pula menjadi faktor yang mengakibatkan perbedaan hasil pengukuran kadar MDA.

6.5 Pengaruh Ekstrak Biji Jintan Hitam terhadap Tingkat Survival Tikus

Selama penelitian salah satu kendala yang dihadapi adalah tingginya angka mortalitas hewan coba. Tingginya angka mortalitas terjadi terutama setelah injeksi STZ dosis rendah (minggu ke-8 hingga minggu ke-12). Diperkirakan keparahan kondisi DM yang dialami hewan coba menjadi penyebab utama kematian. Selain bekerja dengan menghasilkan ion karbonium, STZ juga memutus rantai DNA yang akan mengakibatkan aktivasi *poly (ADP-ribose) polymerase* (PARP) dan depleksi *nicotinamide adenine dinucleotide* (NAD) sehingga menyebabkan kematian sel (Arulmozhi *et al.*, 2004). Faktor usia tikus dapat pula menjadi penyebab kematian yang mungkin diakibatkan karena adanya perbedaan secara anatomi, fisiologi dan biologikal antara tikus yang memiliki usia lebih tua dibandingkan dengan tikus pada usia yang relatif muda (Andreollo *et al.*, 2012).

Setiap hewan coba yang mengalami kematian, dilakukan pembedahan untuk diambil beberapa organ yang akan dianalisa. Pada beberapa hewan coba ditemui adanya pembesaran organ pencernaan terutama usus (Lampiran 13). Menurut penelitian AbuKhader (2012) tentang efek rute pemberian *thymoquinone* pada tikus Wistar jantan dan betina, didapatkan adanya tanda-tanda toksisitas yang mirip dengan yang ditemui dalam penelitian ini. Pada penelitian tersebut, tikus diberikan *thymoquinone* rute per oral dengan dosis 200, 300 dan 500 mg/kgBB selama 5 hari. Setelah dilakukan laparotomi (pembedahan pada

dinding abdomen) didapatkan adanya penggelembungan usus halus pada beberapa tikus yang diberikan *thymoquinone* dengan rute per oral. Berdasarkan hasil analisa, adanya distensi abdomen diakibatkan karena *thymoquinone* secara *in vivo* dianggap sebagai *redox cycler* yang selanjutnya dimetabolisme menjadi radikal *hydroquinone* atau *semiquinone* dengan reaksi enzimatik atau non enzimatik yang menyebabkan timbulnya radikal anion superoksida.

Radikal superoksida dan hidrogen peroksida meningkatkan permeabilitas mukosa dan vaskular yang terlibat dalam aktivasi neutrofil. Hal ini dapat menyebabkan hiperplasia limfoid yang melibatkan *peyer's patches* yang biasa ditemui pada ileum. Adanya pembesaran *peyer's patches* dapat mengganggu fungsi saraf pleksus myentrik yang bertanggung jawab pada motilitas saluran pencernaan sehingga menyebabkan hilangnya gerakan peristaltik (*adynamic ileus*) dan obstruksi usus. Hal ini menyebabkan akumulasi gas dan cairan dalam lumen usus yang berakibat pada dilatasi usus (AbuKhader, 2012).

6.6 Keterbatasan Penelitian

Jumlah sampel setiap kelompok perlakuan tidak sama, hal ini disebabkan karena tingkat kematian yang tinggi setelah injeksi STZ sehingga tidak semua data dapat diuji secara statistik. Beberapa data nilai kadar MDA diambil dari organ yang sama sehingga kurang representatif, tetapi hal ini penting dilakukan untuk memenuhi syarat uji statistik. Uji kualitatif dan kuantitatif menggunakan KLT maupun GC-MS untuk mengetahui keberadaan zat aktif *thymoquinone* tidak dapat dilakukan. Penggunaan metformin sebagai kontrol positif pada penelitian ini kurang sesuai, untuk penelitian mengenai efek antioksidan pada tikus DM sebaiknya digunakan glibenklamid sebagai pembanding (Ahmadi *et al.*, 2013).