

**EFEK EKSTRAK JINTEN HITAM (*Nigella sativa* L.)
TERHADAP JUMLAH SEL LIMFOSIT T-REGULATOR
CD4⁺CD25⁺FOXP3 PADA PARU MODEL MENCIT ASMA**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Umum**



**Oleh :
Siska Danti Manggarsari
NIM : 0910710015**

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2013**

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

EFEK EKSTRAK JINTEN HITAM (*Nigella sativa* L.) TERHADAP JUMLAH SEL
LIMFOSIT T-REGULATOR CD4⁺CD25⁺FOXP3 PADA PARU MODEL MENCIT ASMA

Oleh :

Siska Danti Manggarsari

NIM: 0910710015

Telah diuji pada:

Hari : Rabu

Tanggal : 27 Februari 2013

Dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji I

dr. Susanthi Djajalaksana, Sp.P

NIP. 140 227 511

Penguji II/Pembimbing I

Penguji III/Pembimbing II

Dr. dr. Wisnu Barlianto, MSi, Med. Sp.A(K)

NIP. 19730726 200501 1008

Dr. dr. Setyawati Soeharto, M.Kes

NIP. 19521027 198103 2001

Mengetahui,
Kepala Jurusan Pendidikan Dokter

Prof. Dr. dr. Teguh Wahyu Sardjono, DTM&H., M.SC., Sp.ParK

NIP. 19520410 198002 1001



KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT karena atas rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul “Efek Ekstrak Jinten Hitam (*Nigella sativa* L.) terhadap Jumlah Sel Limfosit T-Regulator CD4⁺CD25⁺FOXP3 pada Paru Model Mencit Asma”. Penulisan tugas akhir ini merupakan salah satu persyaratan untuk memenuhi gelar sarjana kedokteran umum di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang. Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada:

1. Dr. dr. Karyono Mintaroem, Sp.PA selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya,
2. Dr. dr. Wisnu Barlianto, MSi., Med., Sp.A(K) selaku dosen pembimbing pertama yang telah memperbolehkan penulis mengikuti pohon penelitian disertasi beliau untuk tugas akhir penulis dan senantiasa memberikan bantuan serta bimbingannya dengan sabar dalam penyelesaian tugas akhir ini,
3. Dr. dr. Setyawati Soeharto, M.Kes selaku dosen pembimbing kedua yang dengan sangat baik hati bersedia memberikan bimbingan dan dukungan dalam penyusunan dan penyelesaian tugas akhir ini,
4. Segenap pihak Laboratorium Farmakologi FKUB serta Laboratorium Biomedik FKUB, yang telah menyediakan sarana dan prasarana selama pelaksanaan penelitian tugas akhir ini,
5. Mbak Tata, Mbak Sevita dan sahabat saya tercinta Durrotul Ikrimah yang bersama-sama berpartisipasi dalam pohon penelitian “Jinten Hitam” dan berjuang bersama, saling membantu dan mendukung satu sama lain selama proses penyusunan tugas akhir ini.

6. Orang tua penulis; M. Koesbeni dan Endang Wahyu, kakak-kakak penulis; Janur Yudho dan Mayang Dewi, serta eyang putri penulis; Soetini, atas doa dan dukungan mereka yang tiada henti, dan
7. Kolega Pendidikan Dokter 2009 yang telah berjuang bersama dan seluruh pihak yang telah membantu penulis dengan tulus.

Tentunya tugas akhir ini tidak terlepas dari kekurangan. Maka dari itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang sekiranya membangun. Semoga tugas akhir ini menjadi salah satu pengisi khasanah ilmu pengetahuan pembaca dan dapat bermanfaat untuk perkembangan ilmu kedokteran dan kesehatan.

Malang, Februari 2013

Penulis



ABSTRAK

Manggarsari, Siska Danti. 2013. **Efek Ekstrak Jinten Hitam (*Nigella sativa* L.) terhadap Jumlah Sel Limfosit T-Regulator CD4⁺CD25⁺FOXP3 pada Paru Model Mencit Asma.** Tugas Akhir, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pembimbing: (1) Dr. dr. Wisnu Barlianto, MSi., Med., Sp.A(K). (2) Dr. dr. Setyawati Soeharto, M.Kes.

Asma bronkial adalah inflamasi kronis pada saluran napas bronkus yang ditandai dengan keadaan klinis berupa episode sesak napas berulang dan dapat mereda dengan sendirinya. Sel dan mediator inflamasi pada asma diatur oleh sel Th2. Sel T-regulator CD4⁺CD25⁺FOXP3 diperlukan untuk supresi sel Th2. Jinten hitam (*Nigella sativa* L.) dikenal sejak ribuan tahun memiliki efek terhadap sistem imun. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui efek ekstrak jinten hitam terhadap jumlah sel limfosit T-regulator CD4⁺CD25⁺FOXP3 pada paru model mencit asma. Studi *in vivo* menggunakan desain eksperimental murni dilakukan pada mencit galur *Balb/C*. Model mencit asma diperoleh dengan sensitisasi awal alergen ovalbumin secara intraperitoneal pada hari ke-0 dan ke-14 dan sensitisasi berulang secara inhalasi 3 kali seminggu selama 6 minggu. Sampel dipilih secara random dan dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan yang masing-masing terdiri atas 4 mencit, yaitu kelompok tanpa perlakuan apapun (kontrol negatif), kelompok dengan sensitisasi saja (kontrol positif), dan kelompok JH1, JH2, JH3 yang diberi sensitisasi dan ekstrak jinten hitam dengan dosis masing-masing 1,2 g/kgBB/hari, 2,4 g/kgBB/hari, dan 4,8 g/kgBB/hari secara per oral dengan sonde selama 9 minggu. Parameter yang diukur adalah jumlah sel limfosit T-regulator CD4⁺CD25⁺FOXP3 pada darah perifer menggunakan *flow cytometry* dengan marker ekspresi CD4 dan CD25 pada permukaan sel dan ekspresi FOXP3 pada sitoplasma. Didapatkan perbedaan jumlah sel limfosit T-regulator CD4⁺CD25⁺FOXP3 yang signifikan ($p < 0,05$) antara kelompok kontrol negatif dengan keempat kelompok lainnya, serta antara kontrol positif dengan JH2 dan JH3, antara kelompok JH1 dan JH2 serta JH 1 dan JH3. Tidak ditemukan perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol positif dengan JH1 serta antara kelompok JH2 dan JH3. Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak jinten hitam dapat meningkatkan jumlah sel limfosit T-regulator CD4⁺CD25⁺FOXP3 dengan dosis optimal 2,4 g/kgBB/hari.

Kata kunci: asma, limfosit t-regulator CD4⁺CD25⁺FOXP3, jinten hitam

ABSTRACT

Manggarsari, Siska Danti. 2013. **The Effects of Black Seed Extracts (*Nigella sativa* L.) on CD4⁺CD25⁺FOXP3 Regulatory Lymphocyte T Cell Count in The Lungs of Asthma Mouse Model**. Final Assignment, Faculty of Medicine, Brawijaya University Malang. Supervisors: (1) Dr. dr. Wisnu Barlianto, MSi., Med., Sp.A(K). (2) Dr. dr. Setyawati Soeharto, M.Kes.

Bronchial asthma is a chronic inflammation of the airways characterized by clinical conditions such as recurrent episodes of shortness of breath and may subside by themselves. Cells and inflammatory mediators in asthma is regulated by Th2 cells. The CD4⁺CD25⁺FOXP3 regulatory lymphocyte T cell (Tregs) is required for suppression of Th2 cells. Black seed (*Nigella sativa* L.) is known for thousands of years has an effect on the immune system. The purpose of this study to determine the effects of black seed extracts on the number of CD4⁺CD25⁺FOXP3 Tregs in the lungs of asthma mouse model. In vivo studies using pure experimental design was conducted on mice strains BALB/c. Mouse asthma model obtained with early intraperitoneal sensitization using ovalbumin as an allergen on days 0 and 14 and repeated sensitization by inhalation 3 times a week for 6 weeks. Samples were selected randomly and divided into 5 treatment groups, each consisting of 4 mice; without any treatment group (negative control), the group with sensitization alone (positive control), and the JH1, JH2, JH3 with sensitization and black seed extract with each dose of 1.2 g/kgBD/day, 2.4 g/kgBW/day, and 4.8 g/kgBW/day orally for 9 weeks. Flow cytometry was used to study the number of CD4⁺CD25⁺FOXP3 Tregs in peripheral blood lymphocytes using specific markers: cell-surface CD4 and CD25 expression and cytoplasmic FOXP3 expression. It was obtained that the differences in the number of CD4⁺CD25⁺FOXP3 Tregs which is significant ($p < 0.05$) between negative control group with four other groups, as well as the positive control with JH2 and JH3, between the JH1 and JH2 and between JH1 and JH3. No significant differences between the positive control group and between groups JH1, and between JH2 and JH3. The conclusion of this study is the black seed extract has an effect on CD4⁺CD25⁺FOXP3 Tregs cell count and can increase the number of CD4⁺CD25⁺FOXP3 Tregs with the optimal dose of 2.4g/kgBW/day.

Keywords: asthma, CD4⁺CD25⁺FOXP3 Tregs, black seed

DAFTAR ISI

	Halaman
Judul	i
Halaman Pengesahan	ii
Kata Pengantar	iii
Abstrak	v
Abstract	vi
Daftar Isi	vii
Daftar Gambar	xi
Daftar Tabel	xii
Daftar Lampiran	xiii
 BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Manfaat Penelitian	6
 BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Jinten Hitam (<i>Nigella sativa</i> L.)	8
2.1.1 Sejarah Jinten Hitam	8
2.1.2 Taksonomi dan Morfologi Jinten Hitam	9
2.1.3 Kandungan Jinten Hitam	11
2.1.4 Kegunaan Jinten Hitam	12
2.1.5 Imunofarmakologi dan Toksikologi Jinten Hitam	12
2.2 Asma Bronkial	13



2.2.1 Definisi Asma Bronkial	13
2.2.2 Epidemiologi Asma Bronkial	14
2.2.3 Anatomi dan Histologi Saluran Napas Terkait Asma Bronkial	14
2.2.4 Patogenesis dan Patofisiologi Asma Bronkial	18
2.2.5 Peran Limfosit pada Asma Bronkial	23
2.2.6 Faktor Risiko Asma Bronkial	26
2.2.7 Diagnosis Asma Bronkial	28
2.2.8 Klasifikasi Asma Bronkial	29
2.2.9 Eksaserbasi Asma Bronkial	30
2.2.10 Pencegahan Asma Bronkial	31
2.2.11 Pengobatan Asma Bronkial	31

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep	34
3.2 Hipotesis Penelitian	35

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian	36
4.2 Populasi dan Sampel Penelitian	36
4.2.1 Pemilihan Sampel	36
4.2.2 Jumlah Sampel	37
4.3 Variabel Penelitian	38
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian	39
4.5 Instrumen Penelitian	39
4.5.1 Alat	39



4.5.2 Bahan	42
4.6 Definisi Operasional	43
4.7 Prosedur Penelitian.....	44
4.7.1 Aklimatisasi	44
4.7.2 Ekstraksi Jinten Hitam	45
4.7.3 Penentuan Dosis Jinten Hitam	46
4.7.4 Pembagian Kelompok Perlakuan	47
4.7.5 Sensitisasi Mencit	48
4.7.6 Pemberian Ekstrak Jinten Hitam	50
4.7.7 Pengambilan Spesimen	50
4.7.8 Pemeriksaan dengan Metode <i>Flow Cytometry</i>	51
4.8 Pengolahan dan Analisis Data	52
4.9 Alur Kerangka Kerja Penelitian	53
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	
5.1 Hasil Penelitian	54
5.2 Analisis Data	57
BAB 6 PEMBAHASAN.....	56
BAB 7 PENUTUP	
7.1 Kesimpulan	67
7.2 Saran	67
DAFTAR PUSTAKA	69
LAMPIRAN	72

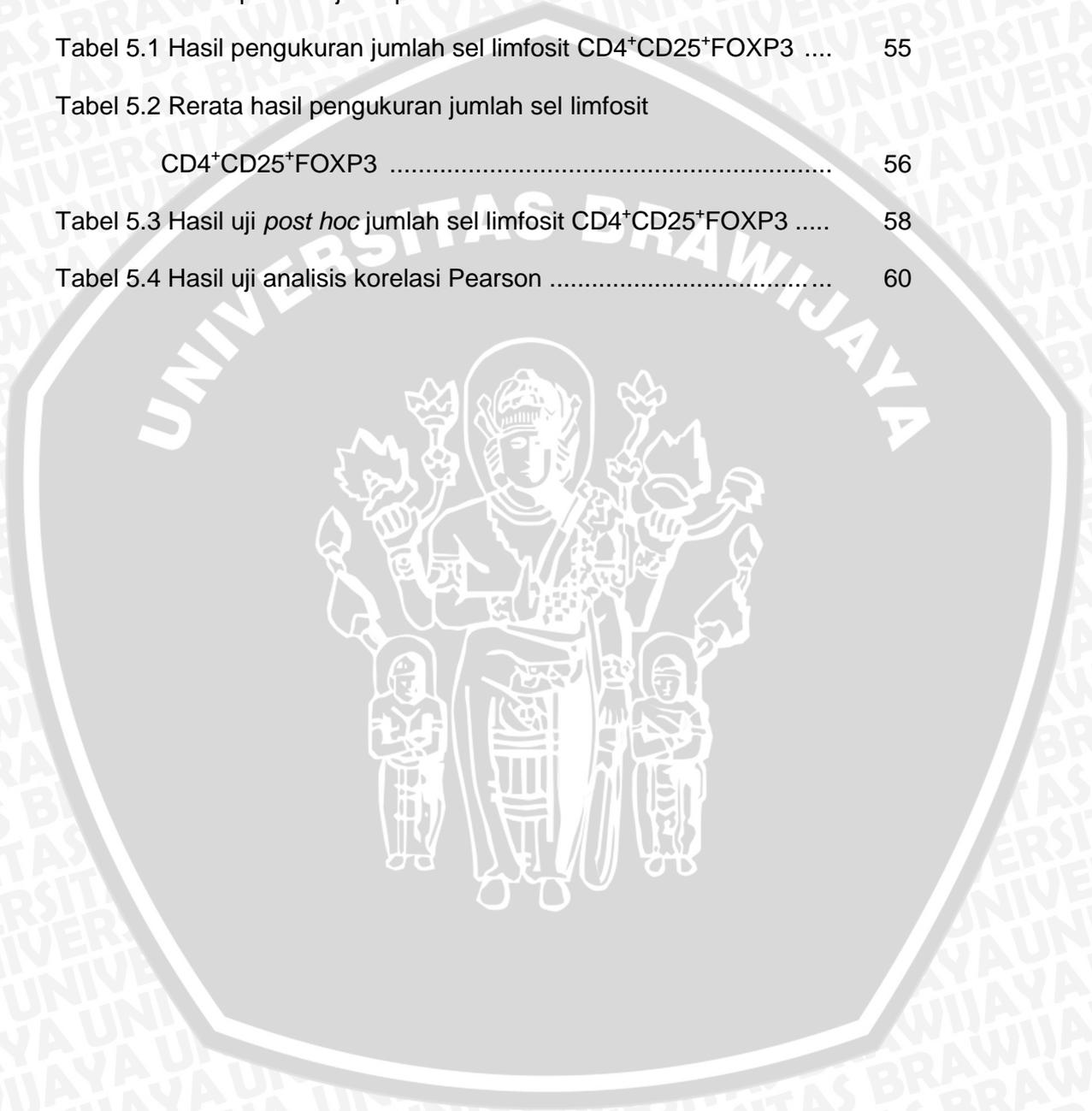
DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 <i>Nigella sativa</i> L.	9
Gambar 2.2 Biji <i>Nigella sativa</i> L.	10
Gambar 2.3 Bunga <i>Nigella sativa</i> L.	10
Gambar 2.4 Struktur kimia dari bahan aktif thymoquinone (TQ), dithymoquinone (DTQ), thymol (THY) dan thymohydroquinone (THQ) pada minyak jinten hitam	11
Gambar 2.5 Gambaran umum anatomi sistem pernapasan	16
Gambar 2.6 Histologi bronkus	17
Gambar 2.7 Ikatan silang antigen-IgE yang mengaktifkan sel mast	20
Gambar 2.8 Sel-sel imun dan inflamasi yang terlibat pada asma	21
Gambar 2.9 Perbandingan bronkus pada individu normal dan penderita asma	23
Gambar 3.1 Kerangka konsep penelitian	34
Gambar 4.1 Instrumen sensitisasi inhalasi	41
Gambar 4.2 Alur kerja penelitian	53
Gambar 5.1 Grafik perbandingan rata-rata jumlah sel limfosit CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 pada setiap kelompok	56



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Kelompok dan jenis perlakuan	48
Tabel 5.1 Hasil pengukuran jumlah sel limfosit CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3	55
Tabel 5.2 Rerata hasil pengukuran jumlah sel limfosit CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3	56
Tabel 5.3 Hasil uji <i>post hoc</i> jumlah sel limfosit CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3	58
Tabel 5.4 Hasil uji analisis korelasi Pearson	60



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Ethical Clearance	72
Lampiran 2 Sertifikat Mencit BALB/c.....	75
Lampiran 3 Sertifikat Jinten Hitam	76
Lampiran 4 Sertifikat Ovalbumin	77
Lampiran 5 Jadwal Sensitisasi Inhalasi.....	76
Lampiran 6 Jadwal Sonde Jinten Hitam.....	78
Lampiran 7 Dokumentasi Penelitian	82
Lampiran 8 Hasil Pengukuran Jumlah Sel Limfosit CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3	83
Lampiran 9 Rerata Jumlah Sel Limfosit CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3	84
Lampiran 10 Hasil Uji Normalitas	85
Lampiran 11 Hasil Uji <i>One-Way</i> ANOVA	88
Lampiran 12 Hasil Uji Post Hoc	89
Lampiran 13 Hasil Uji Korelasi Pearson	90
Lampiran 14 Pernyataan Keaslian Tulisan	91

BAB 1**PENDAHULUAN****1.1 Latar Belakang**

Asma bronkial adalah inflamasi kronis pada saluran napas bronkus yang ditandai dengan keadaan klinis berupa episode sesak napas berulang dan dapat mereda dengan sendirinya. Penyebab pasti dari asma belum diketahui, namun asma hampir selalu berasosiasi dengan reaksi hipersensitivitas (Price and Wilson, 2002). Serangan asma mengenai individu segala umur dan jenis kelamin dengan berbagai tingkat keparahan yaitu mulai dari intermiten ringan hingga berat. Serangan ini dapat dikontrol dengan menghindari pencetus dan dengan terapi farmakologis. Penyakit ini dapat menghilang namun tidak jarang terjadi eksaserbasi, terutama pada asma yang tidak dikontrol sehingga dapat mempengaruhi aktivitas hidup individu bahkan mengancam jiwa.

Asma telah menjadi masalah kesehatan dunia, dengan estimasi 300 juta penduduk dunia mengidap peradangan kronis ini. Prevalensi global berkisar 1% - 18% populasi dari berbagai negara. Dilaporkan bahwa terjadi penurunan prevalensi di Amerika Utara dan Eropa Barat pada kelompok individu usia 13 – 14 tahun dan adanya peningkatan prevalensi pada wilayah yang sebelumnya memiliki prevalensi yang rendah (GINA, 2011). Meningkatnya gejala asma di Afrika, Amerika Latin dan Asia mengindikasikan bahwa beban asma global akan terus meningkat. Angka kematian akibat asma di dunia mencapai 250.000 tiap tahun dan tampak tidak adanya suatu korelasi tertentu antara mortalitas dan

prevalensi. Tidak ada data yang cukup untuk mengetahui alasan bervariasinya prevalensi asma baik dalam suatu populasi. Selain itu asma juga mengakibatkan hambatan sosial dan ekonomi. Berdasarkan studi yang dilakukan di regio Asia – Pasifik, India, Amerika Latin, Inggris dan Amerika, ketidakhadiran di sekolah dan tempat kerja adalah konsekuensi sosial dan ekonomi yang substansial akibat asma (GINA, 2011). Menurut Departemen Kesehatan Republik Indonesia, diperkirakan 10% dari 250 juta penduduk Indonesia menderita asma (Nelawati, 2008). Hasil penelitian *International Study on Asthma and Allergies in Childhood* pada tahun 2005 menunjukkan bahwa di Indonesia prevalensi gejala penyakit asma meningkat dari 4,2% menjadi 5,4% (Sundaru, 2006). Pengamatan di lima propinsi di Indonesia (Sumatra Utara, Jawa Tengah, Jawa Timur, Kalimantan Barat dan Sulawesi Selatan) yang dilaksanakan oleh Subdit Penyakit Kronik dan Degeneratif Lain pada bulan April tahun 2007 menunjukkan bahwa umumnya upaya pengendalian asma belum terlaksana dengan baik dan masih sangat minimnya ketersediaan peralatan yang diperlukan untuk diagnosis dan tata laksana pasien asma di fasilitas kesehatan (Depkes RI, 2009).

Proses inflamasi yang terjadi pada asma bronkial melibatkan berbagai sel dan mediator. Sel-sel tersebut adalah limfosit T, limfosit B, eosinofil, makrofag, sel mast, sel epitel, fibroblast dan sel otot polos bronkus. Limfosit T yang berperan pada asma adalah limfosit T CD4⁺ subtipe Th2 dan limfosit ini mengeluarkan sitokin interleukin (IL), yaitu IL-3, IL-4, IL-5, IL-13. Interleukin-4 berperan dalam menginduksi *T-helper* (Th)0 menjadi Th2 dan bersama IL-13 menginduksi sel limfosit B untuk mensintesis IgE. Interleukin-3, IL-5, serta *Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor* (GM-CSF) berperan pada maturasi, aktivasi dan memperpanjang ketahanan hidup eosinofil. Perubahan

morfologi dinding bronkus yang terjadi pada asma adalah edema, hiperemia dan infiltrat sel-sel radang, peningkatan ukuran kelenjar mukus submukosa atau peningkatan jumlah sel goblet di epitel bronkus, bercak nekrosis dan terlepasnya sel epitel (Rakhmatiar, 2009). Selain itu terdapat pula peningkatan kolagen yang terletak di bawah membran basal sehingga dinding saluran napas tampak menebal. Perubahan ini diperkirakan terjadi karena pengaktifan sel fibroblast yang diperantai sitokin untuk menghasilkan kolagen (*airway remodeling*). Kemudian terjadi hipertrofi dan hiperplasia otot polos, terutama di dinding saluran napas besar dan sedang (Robbins *et al.*, 2003).

Subtipe limfosit T CD4⁺ lain yang memiliki peran penting dalam patogenesis penyakit asma bronkial adalah limfosit *T-regulator* (T-regulator) yang mempunyai efek supresif pada limfosit T CD4⁺ lainnya dan berperan dalam regulasi fungsi limfosit Th2. Limfosit T-regulator pada individu pengidap asma mengalami defek, sehingga proliferasi limfosit Th2 tidak ada yang mengontrol. Bukti terkini menyatakan bahwa limfosit T-regulator CD4⁺CD25⁺ yang mengekspresikan gen faktor transkripsi *forkhead box P3* (FOXP3) menurun pada individu dengan rhinitis alergi dibandingkan dengan individu non-atopik (Barnes, 2008). Studi yang dilaksanakan pada mencit menunjukkan bahwa gen FOXP3, yang mengkode faktor transkripsi Scurfin, adalah gen regulator utama untuk perkembangan dan fungsi dari T-regulator CD4⁺CD25⁺ (Yagi *et al.*, 2004).

Terapi farmakologis yang tersedia untuk mananggulangi asma, menurut Pedoman Pengendalian Penyakit Asma di Indonesia Depkes RI (2009), terdiri atas obat pelega yang digunakan ketika muncul serangan dan obat pengontrol untuk pencegahan serangan asma yang diberikan dalam jangka panjang dan terus menerus. Golongan obat pelega yaitu agonis β -2 kerja cepat (salbutamol),

antikolinergik (ipatropium bromida), metylxantin (teofilin) dan kortikosteroid sistemik (prednison). Sedangkan obat pengontrol asma yaitu agonis β -2 kerja lama (salmeterol), antileukotrien (zafirlukast) dan kortikosteroid inhalasi (budesonide). Berdasarkan pedoman asma dari *Global Initiative for Asthma* tahun 2011, terapi pilihan untuk mengatasi serangan akut asma adalah agonis β -2 kerja cepat inhalasi yang melegakan konstiksi bronkus dan sebagai premedikasi konstiksi bronkus yang diinduksi aktifitas fisik, baik untuk anak-anak maupun orang dewasa di segala usia. Sedangkan terapi pengontrol yang paling efektif saat ini adalah kortikosteroid inhalasi (GINA, 2011). Tetapi, kortikosteroid hanyalah bersifat mencegah (*controller*) asma dan selain itu pemakaian steroid dosis tinggi dalam jangka panjang akan menimbulkan efek samping sistemik, seperti supresi adrenal, osteoporosis, katarak dan glaukoma (GINA, 2011). Banyaknya efek samping pada pengobatan konvensional, menyebabkan penelitian terhadap produk natural seperti tanaman obat sebagai alternatif terapi yang mungkin lebih aman dan efektif diminati oleh banyak peneliti di seluruh dunia beberapa dekade terakhir ini.

Jinten hitam (*Nigella sativa* L.) atau dikenal dengan nama *habbatussauda*, *black seed* dan *black cumin*, telah dikenal sejak ribuan tahun lalu dan digunakan secara luas oleh masyarakat Timur Tengah untuk mengobati berbagi macam penyakit. Tanaman jinten hitam banyak ditemukan di Eropa selatan, Afrika utara dan Asia. Dalam agama Islam, Nabi Muhammad SAW bersabda bahwa di dalam jinten hitam terdapat obat bagi semua penyakit kecuali kematian (Yulianti dan Junaedi, 2006). Banyak studi yang melaporkan bahwa ekstrak jinten hitam yang digunakan secara tradisional sebagai pengobatan inflamasi, asma, bronkitis dan eksim, memiliki beberapa efek biologis. Efek

tersebut antara lain stimulasi imun, antiinflamasi, antitumor dan antioksidan. Bahan aktif utama pada biji jinten hitam, yaitu *thymoquinone* telah terbukti menghambat inflamasi yang diinduksi alergen dengan menghambat sitokin limfosit Th2, infiltrasi eosinofil dan hiperplasia sel goblet pada saluran napas mencit yang diinduksi inflamasi oleh antigen ovalbumin (Gazzar *et al.*, 2006). Penelitian yang dilakukan Shahzad *et al.* pada tahun 2008, membuktikan bahwa pemberian minyak jinten hitam (*Nigella sativa L.*) dapat menghambat respons dan proliferasi limfosit T pada tikus yang diinduksi asma. Jinten hitam juga meningkatkan rasio sel limfosit CD4 terhadap CD8 (Salem, 2005). Dalam banyak studi lainnya, telah disebutkan bahwa jinten hitam memiliki beragam efek terhadap sistem imun. Saat ini, perkembangan terapi asma diarahkan pada modulasi sistem imun. Pentingnya peran limfosit T-regulator CD4⁺CD25⁺FOXP3 dalam patogenesis asma membuatnya menjadi salah satu target pendekatan imunoterapi asma. Namun hingga sekarang, belum ada penelitian yang mempelajari efek jinten hitam terhadap jumlah sel limfosit T-regulator CD4⁺CD25⁺FOXP3. Maka dari itu, penelitian ini akan menguji efek ekstrak jinten hitam terhadap jumlah sel limfosit terfokus pada limfosit T-regulator CD4⁺CD25⁺FOXP3 pada paru model mencit asma.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah ekstrak jinten hitam (*Nigella sativa L.*) dapat mempengaruhi jumlah sel limfosit T-regulator CD4⁺CD25⁺FOXP3 pada paru model mencit asma?

Submasalah

1. Apakah peningkatan dosis ekstrak jinten hitam (*Nigella sativa* L.) dapat meningkatkan jumlah sel limfosit T-regulator CD4⁺CD25⁺FOXP3 pada paru model mencit asma?
2. Berapa dosis optimal ekstrak jinten hitam (*Nigella sativa* L.) yang dapat meningkatkan jumlah sel limfosit T-regulator CD4⁺CD25⁺FOXP3 pada paru model mencit asma?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

1. Untuk mengetahui efek ekstrak jinten hitam (*Nigella sativa* L.) terhadap jumlah sel limfosit T-regulator CD4⁺CD25⁺FOXP3 pada paru model mencit asma.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui apakah peningkatan dosis ekstrak jinten hitam (*Nigella sativa* L.) akan meningkatkan jumlah sel limfosit T-regulator CD4⁺CD25⁺FOXP3 pada paru model mencit asma
2. Untuk mengetahui dosis optimal ekstrak jinten hitam (*Nigella sativa* L.) yang dibutuhkan untuk meningkatkan jumlah sel limfosit T-regulator CD4⁺CD25⁺FOXP3.

1.4 Manfaat Penelitian

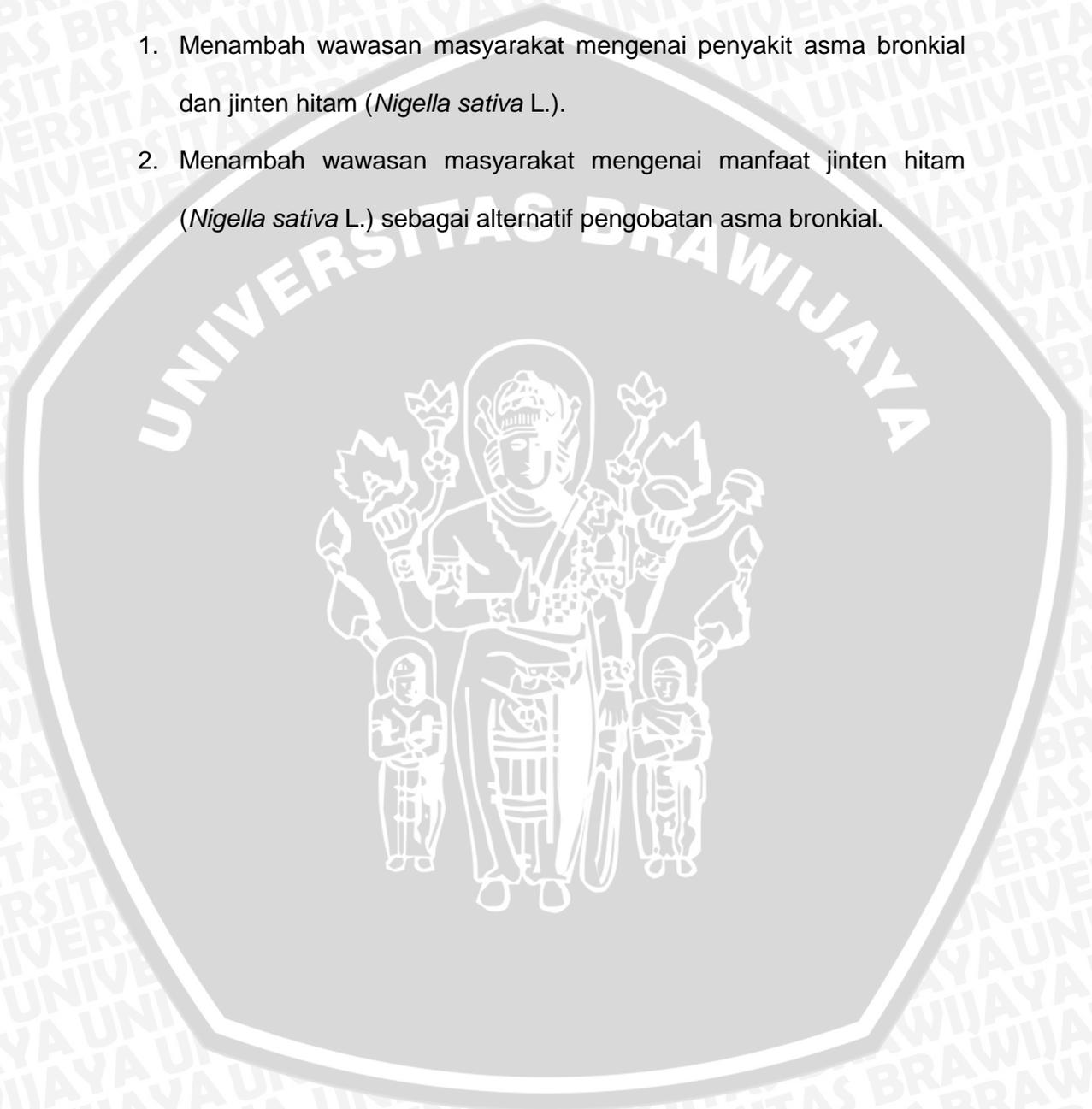
1.4.1 Manfaat Akademis

1. Menambah khasanah ilmu pengetahuan mengenai penyakit asma bronkial dan jinten hitam (*Nigella sativa* L.).

2. Menjadi dasar ilmiah untuk pengembangan terapi asma bronkial khususnya menggunakan jinten hitam (*Nigella sativa* L.).

1.4.2 Manfaat Praktis

1. Menambah wawasan masyarakat mengenai penyakit asma bronkial dan jinten hitam (*Nigella sativa* L.).
2. Menambah wawasan masyarakat mengenai manfaat jinten hitam (*Nigella sativa* L.) sebagai alternatif pengobatan asma bronkial.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Jinten Hitam (*Nigella sativa* L.)

2.1.1 Sejarah Jinten Hitam

Nigella sativa L., memiliki sebutan yang berbeda-beda di setiap tempat. Di negara-negara barat dikenal dengan nama *black seed*, *black cumin* dan *coriander seed*. Di negara-negara Arab dikenal dengan nama *habbatussauda* (biji hitam) dan *habbatul baraka* (biji yang diberkati). Sementara di Persia, disebut dengan *shonaiz*, di Turki disebut *cotu siyah* dan dalam bahasa Hindi dikenal dengan nama *kalounji*. Sedangkan di Indonesia dan Malaysia dikenal dengan sebutan jinten hitam (Yulianti dan Junaedi, 2006). Jinten hitam ini telah dikenal dan digunakan sejak ribuan tahun lalu. Negeri-negeri di jazirah Arab, India dan Eropa menggunakan biji jinten hitam sebagai rempah-rempah dan pengobatan tradisional beberapa penyakit seperti asma, hipertensi, diabetes, inflamasi, batuk, bronkitis, sakit kepala, eksim, demam, lemas dan influenza (Ali and Blunden, 2003). Ibnu Sina dalam *The Canon of Medicine* menyatakan bahwa jinten hitam dapat menstimulasi energi di tubuh dan membantu penyembuhan kelelahan. Begitu pula dengan sabda Nabi Muhammad SAW bahwa pada jinten hitam terdapat obat bagi segala penyakit, kecuali kematian (Yulanti dan Junaedi, 2006).

2.1.2 Taksonomi dan Morfologi Jinten Hitam

Taksonomi tanaman jinten hitam adalah berikut ini:

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Subkingdom	: <i>Traceabionta</i>
Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Subdivisi	: <i>Magnoliophyta</i>
Kelas	: <i>Magnoliopsida dicotyledon</i>
Subkelas	: <i>Magnoliidae</i>
Ordo	: <i>Ranunculales</i>
Famili	: <i>Ranunculaceae</i>
Genus	: <i>Nigella</i> L.
Spesies	: <i>Nigella sativa</i> L. (Yulianti dan Junaedi, 2006).



Gambar 2.1 *Nigella sativa* L., (Koehler, 2004).

Tanaman jinten hitam termasuk tanaman setahun. Tanaman ini berbatang tegak dan biasanya berusuk, serta berbulu kasar yang kadang-kadang rapat atau jarang. Daun jinten hitam berwarna hijau, berbentuk lanset dan bergaris dengan panjang 1,5 – 2 cm, ujung meruncing, serta memiliki tiga tulang daun yang berbulu. Bunga jinten hitam memiliki lima kelopak dengan bentuk oval yang ujungnya meruncing. Mahkota bunga umumnya ada delapan dengan bentuk memanjang, berbulu dan lebih kecil daripada kelopak. Benang sari berjumlah banyak dengan kepalanya berwarna kuning. Bagian tanaman yang biasa dimanfaatkan adalah bijinya. Biji jinten hitam berwarna hitam, kecil dan pendek (1 – 3 mm), berbentuk trigonal, berkelenjar dan tampak seperti batu api jika diamati dengan mikroskop. Biji-biji ini berada di dalam buah yang berbentuk bulat telur (Yulianti dan Junaedi, 2006).



Gambar 2.2 Biji *Nigella sativa* L., (Yulianti dan Junaedi, 2006).



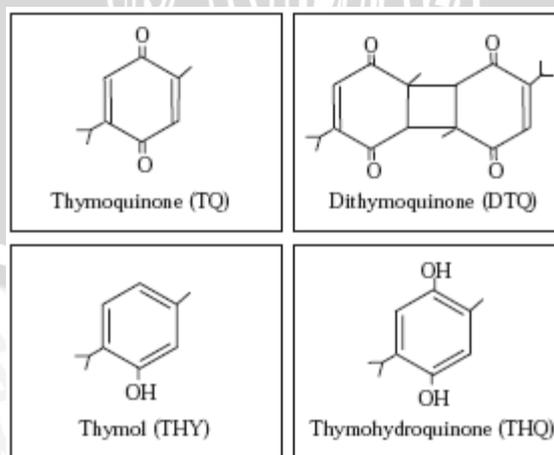
Gambar 2.3 Bunga *Nigella sativa* L., (Henriette, 2000).

Jinten hitam tumbuh di ketinggian kurang dari 700 m di bawah permukaan laut, memerlukan suhu udara 9 – 45°C, kelembapan 70% - 90%, penyinaran matahari penuh, membutuhkan tanah lempung berpasir dengan pH 4,5 – 6, penambahan pupuk organik, drainase dan tata udara yang baik pada tanah. Di negara empat musim, tanaman ini akan berproduksi secara optimal pada musim semi. Secara umum, tanaman ini memiliki daya adaptasi yang baik terhadap lingkungan setempat (Yulianti dan Junaedi, 2006).

2.1.3 Kandungan Jinten Hitam

Biji jinten hitam mengandung 36% - 38% *fixed oil*, protein, alkaloid, saponin dan 0.4% - 2.5% minyak esensial. Komposisi utama dari *fixed oil* ialah *unsaturated fatty acid*, termasuk asam arakhidonat dan asam eikosanoat (Ali and Blunden, 2003). Sebanyak empat *belladonna-type* alkaloid terpena, yaitu *nigellamines* A(1)(1), A(2)(2), B(1)(3) dan B(2)(4), telah berhasil diisolasi dari biji jinten hitam. Komposisi minyak esensial yang utama adalah *thymoquinone* (27.8% - 57%), *p-cymene* (7.1% - 15.5%), *carvacol* (5.8% - 11.6%), *t-anethole* (0.25% - 2.35%), *4-terpineol* (2.0% - 6.6%) dan *longifolilne* (1.9% - 8.0%) (Ali and Blunden, 2003). Hasil analisis *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) pada minyak jinten hitam mengindikasikan adanya bahan aktif, yaitu *thymoquinone*, *dithymoquinone*, *thymol* dan *thymohydroquinone*.

Biji jinten hitam juga memiliki kandungan lain seperti vitamin (karoten), mineral (kalsium, besi, kalium), lemak, karbohidrat, termasuk asam amino esensial. Ditemukan pula monosakarida dalam bentuk glukosa, rhamnosa, xylosa dan arabinosa (Salem, 2005).



Gambar 2.4 Struktur kimia dari bahan aktif *thymoquinone* (TQ), *dithymoquinone* (DTQ), *thymol* (THY), dan *thymohydroquinone* (THQ) pada minyak jinten hitam (Salem, 2005).

2.1.4 Kegunaan Jinten Hitam

Secara tradisional, jinten hitam sering digunakan untuk rempah-rempah dan pengobatan. Jinten hitam digunakan untuk mengobati beragam penyakit, termasuk asma bronkial, pusing, disentri, infeksi, obesitas, nyeri punggung, hipertensi dan gangguan saluran pencernaan (Salem, 2005). Selain itu, jinten hitam juga berkhasiat meningkatkan sistem imunitas tubuh (Yulanti dan Junaedi, 2006).

Gazzar *et al.* pada tahun 2006 telah menemukan bahwa *thymoquinone* pada jinten hitam mencegah inflamasi yang diinduksi alergen pada paru dengan menurunkan eosinofil, sitokin Th2, sekresi mucus dan antibodi yang spesifik terhadap alergen. Telah banyak kajian ilmiah mengenai jinten hitam yang dilakukan dalam 20 tahun terakhir, baik *in vitro* maupun *in vivo*. Jinten hitam memiliki banyak efek, seperti antioksidan, antiinflamasi, analgesi, antikarsinogen, antihepatoksisitas, antinefrotoksisitas, antidiabetes, antiulkus, antimikroba, antiparasit serta beberapa efek pada sistem kardiovaskular (Ali and Blunden, 2003).

2.1.5 Imunofarmakologi dan Toksikologi Jinten Hitam

Ekstrak jinten hitam memiliki efek imunologis. Beberapa eksperimen telah membuktikan bahwa *nigellone*, yaitu polimer karbonil dari *thymoquinone* yang diisolasi dari biji jinten hitam, memiliki efek antihistamin pada hewan coba. Jinten hitam dapat mengaktifkan sel-sel limfosit T untuk mensekresikan interleukin, IL-13 dan meningkatkan produksi IL-1B (Ali and Blunden, 2003). Pada penelitian lanjutan, protein hasil purifikasi dari jinten hitam memiliki efek supresif dan stimulatif pada

kultur limfosit (Ali and Blunden, 2003). Salem (2005) menyatakan bahwa jinten hitam dapat meningkatkan rasio sel limfosit CD4⁺ terhadap CD8⁺.

Ekstrak jinten hitam dan komposisi utamanya nampak memiliki level toksisitas yang rendah. Ekstrak jinten hitam yang diberikan secara oral dengan dosis mencapai 10 ml/kg pada tikus dan mencit tidak menyebabkan mortalitas dan toksisitas pada observasi 48 jam pertama (Ali and Blunden, 2003). Pada dosis yang sama, pemberian selama 12 minggu tidak menyebabkan mortalitas ataupun perubahan yang signifikan pada enzim-enzim kunci pada hepar tikus (Ali and Blunden, 2003).

2.2 Asma Bronkial

2.2.1 Definisi Asma Bronkial

Pendefinisian asma didasarkan atas ciri-ciri klinis, fisiologis dan patologis. Ciri-ciri klinis yang dominan adalah riwayat episode sesak, khususnya pada malam hari dan disertai batuk. Adapun tanda fisiologinya yaitu episode obstruksi saluran napas yang menghambat aliran udara ekspirasi. Ciri-ciri patofisiologis yang utama adalah adanya inflamasi dan perubahan struktur jalan napas.

Terdapat 2 mekanisme utama yang menyebabkan munculnya asma, yaitu jalur imunologis dan jalur saraf otonom (Rengganis, 2008). Secara garis besar, jalur imunologis didominasi oleh antibodi IgE yang merupakan reaksi hipersensitifitas tipe 1 (tipe alergi) yang terdiri atas fase cepat dan fase lambat. Sedangkan pada jalur saraf otonom, reaksi asma terjadi melalui refleks saraf. Namun pada penelitian hanya akan membahas patogenesis asma jalur imunologis.

2.2.2 Epidemiologi Asma Bronkial

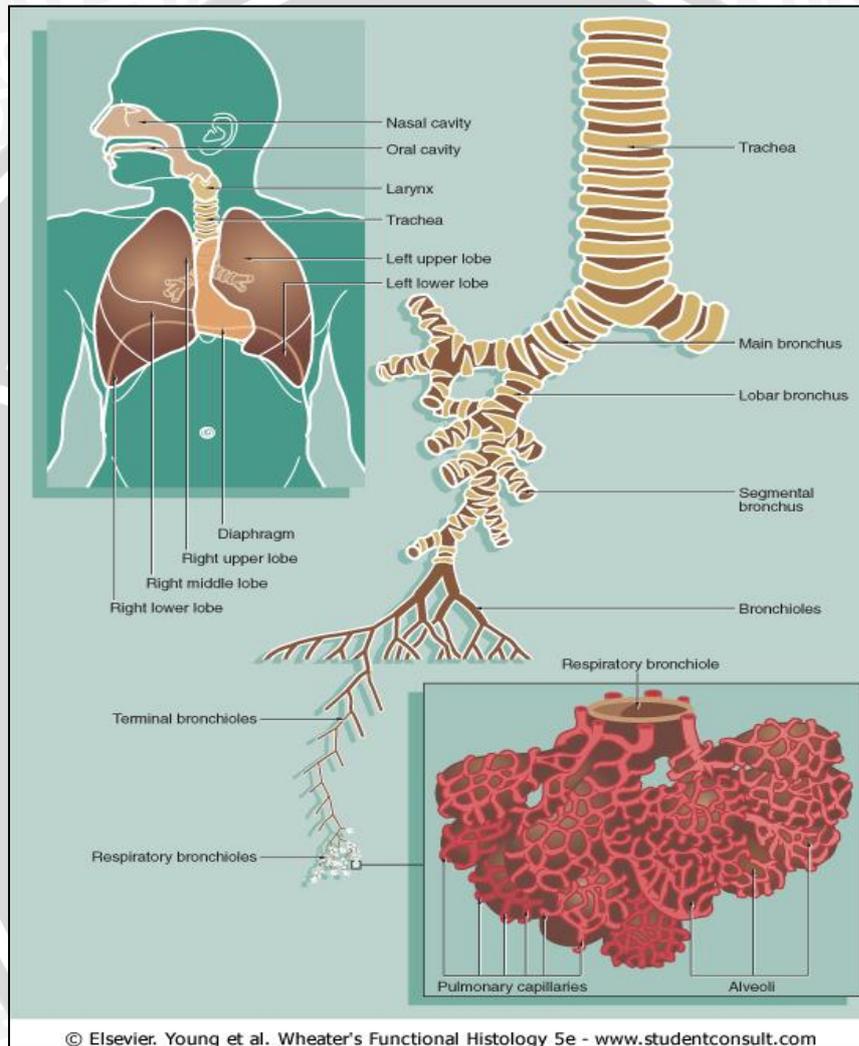
Asma dapat menyerang individu berbagai usia dan semua jenis kelamin. Menurut *World Health Organization* (WHO), ada sekitar 300 juta penduduk dunia mengidap asma. Prevalensi global berkisar 1% - 18% populasi dari berbagai negara. *National Health Statistic Report* melaporkan bahwa pada tahun 2007 ada sekitar 1,75 juta kasus terkait asma di departemen emergensi, 456.000 pasien rawat inap dan pada tahun 2009, prevalensi asma di Amerika Serikat sebesar 8,4%. Hasil penelitian *International Study on Asthma and Allergies in Childhood* pada tahun 2005 menunjukkan bahwa di Indonesia prevalensi gejala penyakit asma meningkat dari 4,2% menjadi 5,4% (Sundaru, 2006). Meningkatnya gejala asma di Afrika, Amerika Latin dan Asia mengindikasikan bahwa beban asma global akan terus meningkat. Angka kematian akibat asma di dunia mencapai 250.000 tiap tahun dan tampak tidak adanya suatu korelasi tertentu antara mortalitas dan prevalensi (GINA, 2011).

2.2.3 Anatomi dan Histologi Saluran Napas Terkait Asma

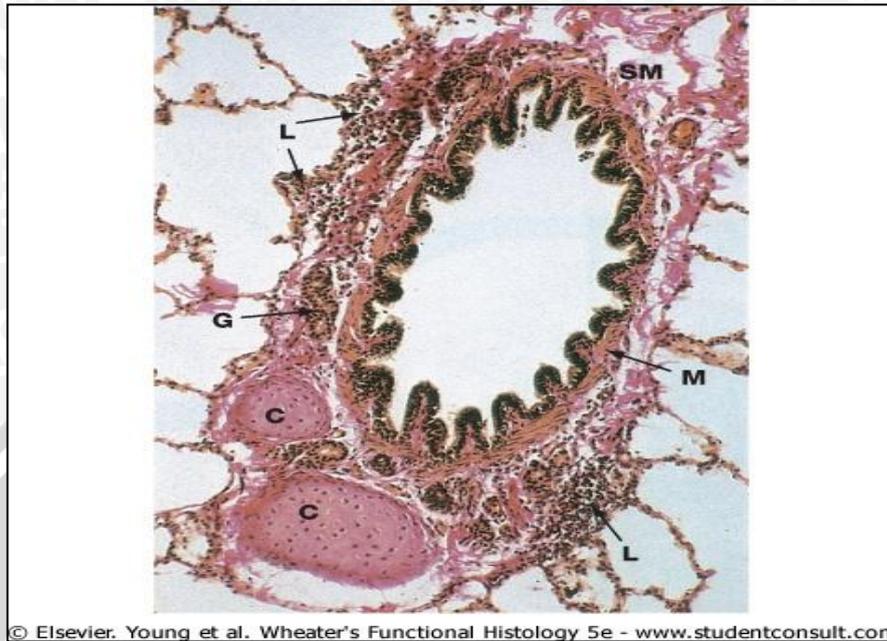
Sistem pernapasan pada manusia terdiri dari dua organ paru dan saluran-saluran napas. Saluran napas dibagi menjadi dua, yaitu bagian konduksi dan bagian respirasi. Bagian konduksi adalah saluran napas yang solid, baik di luar maupun di dalam paru yang berfungsi untuk menyalurkan udara lingkungan luar ke dalam paru tempat berlangsungnya respirasi atau pertukaran gas. Sedangkan bagian respirasi adalah saluran napas di dalam paru tempat berlangsungnya respirasi. Sistem konduksi terdiri atas rongga hidung, faring, laring, trakea, bronkus ekstrapulmonal dan bronkus intrapulmonal. Bagian respirasi terdiri atas bronkiolus terminalis, bronkiolus respiratorius dan alveolus. Masing-masing bagian tersebut memiliki karakteristik mikroskopis tersendiri. Sel-sel epitel pada

saluran napas di luar paru seperti trakea, bronkus, dan bronkiolus yang lebih besar, adalah epitel bertingkat semu silindris bersilia dengan banyak sel goblet. Diameter saluran napas dalam paru secara progresif mengecil. Begitu pula dengan sel-sel epitel yang melapisinya turut semakin memendek, jumlah silia dan sel goblet semakin berkurang. Pertukaran gas hanya terjadi di dalam alveolus, yaitu kantung udara terminal sistem pernapasan. Di sini, epitel pelapisnya adalah epitel selapis gepeng tanpa sel goblet (sel penghasil mukus). Untuk menjamin agar saluran udara tetap terbuka, maka saluran ini memiliki tulang rawan hialin. Trakea dilingkari oleh cincin-cincin tulang rawan hialin berbentuk huruf C. Setelah bercabang menjadi bronkus, cincin hialin diganti oleh lempeng-lempeng tulang rawan hialin. Semakin kecil bronkus, semakin kecil dan sedikit lempeng tulang rawan ini. Saat diameter bronkiolus mengecil hingga kurang lebih 1 mm, semua lempeng hialin menghilang. Bagian konduksi sistem pernapasan yang terkecil adalah bronkiolus terminalis dengan diameter antara 0,5 mm – 1,0 mm. Tinggi epitelnya berubah bersamaan dengan mengecilnya diameter saluran itu. Bronkiolus yang lebih besar dilapisi sel epitel bertingkat semu silindris bersilia, seperti trakea dan bronkus. Epitel ini berangsur memendek hingga menjadi epitel selapis bersilia. Bronkiolus yang lebih besar masih mengandung sel goblet yang berangsur berkurang hingga tidak dijumpai lagi pada bronkiolus terminalis. Bronkiolus yang lebih kecil dilapisi epitel selapis kuboid. Pada bronkiolus terminalis juga terdapat sel kuboid tanpa silia yang disebut sel Clara. Begitu pula dengan silia, akan semakin berkurang hingga tidak ditemukan lagi. Bronkiolus terminalis bercabang lagi menjadi bronkiolus respiratorius yang ditandai dengan adanya alveolus. Bronkiolus respiratorius adalah zona peralihan antara bagian konduksi dan bagian respirasi. Respirasi

hanya berlangsung pada di dalam alveoli karena di sana terdapat sawar antara udara yang masuk ke dalam alveoli dan darah vena dalam kapiler yang sangat tipis. Struktur intrapulmonal lain tempat berlangsungnya respirasi adalah duktus alveolaris, saku alveolaris dan alveoli (Eroschenko, 2000).



Gambar 2.5 Gambaran umum anatomi sistem pernapasan (Young *et al.*, 2007)



© Elsevier. Young et al. Wheater's Functional Histology 5e - www.studentconsult.com

Gambar 2.6 Histologi bronkus (Young *et al.*, 2007)

Dinding bronkus terdiri atas lapisan mukosa, otot polos, submukosa, tulang rawan hialin dan adventisia. Lapisan mukosa terdiri atas epitel bertingkat semu silindris bersilia dengan sel goblet. Lamina propria tipis mengandung serat jaringan ikut halus, jaringan limfatik difus dan terkadang limfonodus solitarius dan serat-serat elastin yang membentuk sebuah membran elastis memanjang. Di antara lamina propria dan lapisan submukosa terdapat lapisan otot polos sirkular. Di jaringan ikat longgar submukosa terdapat kelenjar tubuloasinar campur yang duktusnya melalui lamina propria untuk memasuki lumen. Tulang rawan hialin terdiri dari lempengan-lempengan yang mengelilingi lumen bronkus. Lapisan terluar adalah lapisan adventisia yang terdapat banyak pembuluh darah dan saraf. Selain epitel, tidak ada perbedaan mendasar antara bronkus dan bronkiolus, hanya saja ketebalan otot polos semakin bertambah pada bronkiolus terminalis karena pada bagian ini otot polos berkembang dengan baik (Eroschenko, 2000).

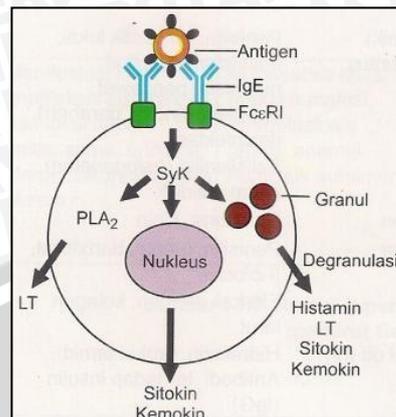
2.2.4 Patogenesis dan Patofisiologi Asma Bronkial

Asma ditandai dengan episode konstriksi bronkus berulang yang terjadi akibat hiperreaktivitas bronkus terhadap berbagai rangsangan. Konstriksi bronkus tersebut dapat mengalami resolusi sendiri. Dasar hiperreaktivitas bronkus ini masih belum sepenuhnya jelas, tetapi diperkirakan karena inflamasi atau peradangan bronkus yang persisten (Robbins *et al.*, 2003). Banyak teori yang mendasari proses inflamasi ini, salah satu teori yang telah diterima secara luas adalah karena alergi. Konsep patogenesis alergi yang dianut saat ini adalah bahwa timbulnya alergi dan perjalanan penyakitnya ditentukan oleh interaksi antara gen dengan lingkungan; seseorang menderita alergi kalau ia memang peka sekaligus terpapar pada rangsangan yang sesuai (Kresno, 2010).

Secara umum, proses mendasar alergi pada asma bronkial diyakini merupakan Reaksi Hipersensitivitas Tipe 1 (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009). Reaksi Hipersensitivitas Tipe 1 disebut juga reaksi cepat atau reaksi anafilaksis atau reaksi alergi, timbul segera sesudah tubuh terpajan dengan alergen. Istilah alergi pertama kali digunakan oleh Von Pirquet pada tahun 1906 yang berasal dari kata *alol* (Yunani) yang berarti perubahan dari asalnya yang dewasa. Ini diartikan sebagai perubahan reaktivitas organisme (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009). Sel-sel yang berperan pada Reaksi Tipe 1 asma adalah sel mast/basofil, limfosit T, limfosit B, eosinofil, epitel, makrofag, otot polos dan fibroblas serta sitokin dan imunoglobulin. Pada reaksi ini, alergen yang masuk ke dalam tubuh menimbulkan respons imun berupa produksi Imunoglobulin E (IgE) dan penyakit alergi seperti rhinitis alergi, dermatitis atopi dan

asma. Menurut Baratawidjaja dan Rengganis (2009), proses terjadinya Reaksi Tipe 1 adalah sebagai berikut:

1. Fase sensitisasi, yaitu waktu yang dibutuhkan untuk pembentukan IgE sampai diikat silang oleh reseptor spesifik ($Fc\epsilon$ -R) pada permukaan sel mast/basofil. Paparan dengan antigen mengaktifkan sel Th2 yang merangsang sel B untuk berkembang menjadi sel plasma yang memproduksi IgE. Molekul IgE yang dilepas lalu diikat oleh reseptor $Fc\epsilon$ -R1 pada sel mast (banyak molekul IgE dengan berbagai spesifitas dapat diikat $Fc\epsilon$ -R1).
2. Fase aktivasi yaitu waktu yang diperlukan antara paparan ulang dengan antigen yang spesifik dan sel mast/basofil melepas isinya yang berisikan granul yang menimbulkan reaksi. Paparan berulang dengan alergen menimbulkan ikatan silang antara antigen dan IgE yang diikat sel mast. Interaksi ikatan silang antara $Fc\epsilon$ -R1 dan IgE pada permukaan sel mast memacu aktivasi protein tirosin kinase (Syk). Sinyal dari Syk dengan cepat ditransduksi yang memacu degranulasi, produksi leukotrien dan transkripsi gen sitokin/kemokin.
3. Fase efektor, yaitu waktu terjadinya respons yang kompleks (anafilaksis) sebagai efek mediator-mediator yang dilepas sel mast dengan aktifitas farmakologik. Pengelepasan mediator inflamasi tersebut menimbulkan kontraksi otot polos, peningkatan permeabilitas vaskular dan vasodilatasi, kerusakan jaringan dan anafilaksis.

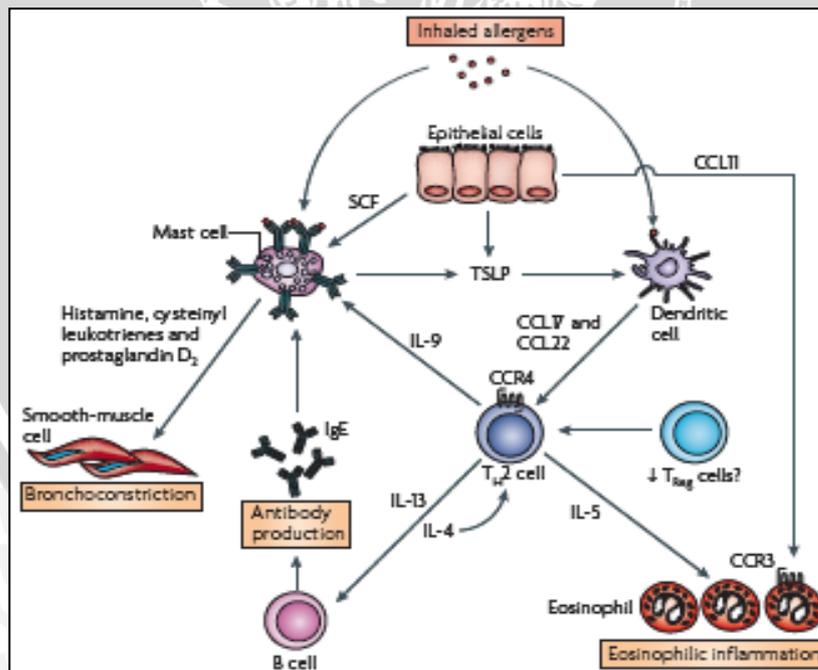


Gambar 2.7 Ikatan silang antigen - IgE yang mengaktifkan sel mast melalui Fcε-R1 (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009).

Antigen yang masuk ke dalam tubuh akan ditangkap oleh sel-sel yang mampu mempresentasikan antigen (*Antigen Presenting Cells, APC*) untuk kemudian menyajikannya kepada limfosit dalam bentuk yang dapat dikenal oleh limfosit. *Antigen Presenting Cell* profesional yang telah dikenal lama adalah makrofag, sel B dan sel dendritik. Akhir-akhir ini, sel dendritik mendapat perhatian cukup besar karena terbukti berfungsi sebagai APC profesional yang bahkan lebih kuat daripada makrofag dan merupakan penghubung antara sistem imun bawaan dan didapat (Kresno, 2010). Ada kemungkinan bahwa sel dendritik dalam epitel (tempat alergen masuk ke dalam tubuh) menangkap alergen dan membawanya ke organ limfoid sekunder, memprosesnya dan menyajikan kepada sel Th2 efektor. Kemudian sel Th2 akan akan mensekresi sitokin IL-4 dan IL-13 yang nantinya akan menstimulasi sel B untuk *isotype switching* dan mensintesis IgE, IL-15 untuk stimulasi sel eosinofil dan IL-9 untuk proliferasi sel mast.

Segera setelah ada sinyal pada membran sel, terjadi serangkaian reaksi biokimia intraselular secara berurutan menyerupai kaskade, dimulai dengan aktivasi enzim metiltransferase dan serine esterase, diikuti perombakan fosfatidil-

inositol (PI) menjadi inositol trifosfat (IP3), pembentukan diasilgliserol (DAG) dan peningkatan kadar ion Ca^{++} intrasitoplasmik. Reaksi-reaksi biokimia ini menyebabkan terbentuknya zat-zat yang memudahkan fusi membran granula sehingga terjadi degranulasi. Degranulasi mengakibatkan pelepasan mediator –mediator yang sebelumnya telah ada di dalam sel (*performed*) misalnya histamin, heparin, faktor kemotaktik eosinofil (*eosinophil chemotactic factor, ECF*), faktor kemotaktik neutrofil (*neutrophil chemotactic factor, NCF*), *platelet activating factor (PAF)*, maupun pembentukan berbagai mediator baru. Di antara mediator yang baru dibentuk adalah *slow reacting substances of anaphylaxis (SRSA)* yang terdiri atas substansi-substansi dengan potensi spasmogenik dan vasodilatasi kuat yaitu leukotrien LTB_4 , LTC_4 dan LTD_4 , di samping beberapa jenis prostaglandin dan tromboksan (Kresno, 2010).



Gambar 2.8 Sel-sel imun dan inflamasi yang terlibat pada asma (Barnes, 2008).

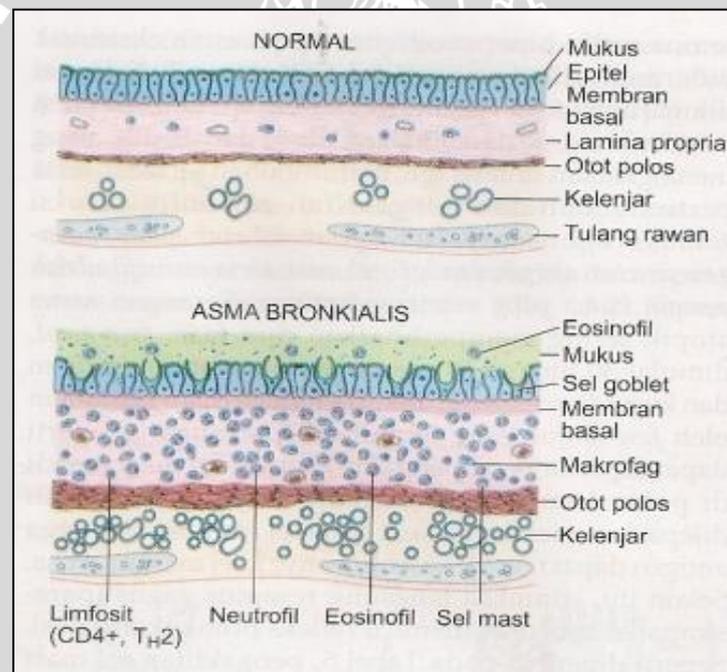
Sel epitel yang teraktivasi pun akan mengekspresikan *membran markers* seperti molekul adhesi, endothelin, *nitric oxide synthase*, sitokin atau kemokin. Epitel pada asma sebagian mengalami *shedding* atau terlepasnya sel epitel. Mekanisme terjadinya dapat disebabkan oleh eksudasi plasma, *oxygen free-radical*, TNF- α , ECF dan metaloprotease sel epitel.

Semua reaksi ini mengakibatkan perubahan struktur pada dinding jalan napas atau dikenal sebagai *airway remodeling*. Hal ini terjadi karena inflamasi yang terus-menerus. Perubahan yang terjadi adalah:

- Hipertrofi dan hiperplasia otot polos jalan napas
- Hipertrofi dan hiperplasia kelenjar mucus
- Penebalan membran basal
- Hiperemia
- Peningkatan fungsi matriks ekstraselular
- Perubahan struktur parenkim
- Peningkatan *fibrogenic growth factor* yang menjadikan fibrosis.

Manifestasi klinis yang muncul adalah sesak, pengeluaran sekret berlebihan dan batuk. Pengidap asma memiliki ketidakmampuan mendasar dalam mencapai angka aliran udara normal selama pernapasan ekspirasi. Ketidakmampuan ini terlihat dari rendahnya volume udara yang dihasilkan sewaktu melakukan usaha ekspirasi paksa pada detik pertama (*forced expiration volume, FEV1*). Karena banyak saluran udara yang menyempit sehingga tidak dapat dialiri dan dikosongkan dengan cepat lalu tidak terjadinya aerasi paru dan hilangnya ruang penyesuaian normal antara ventilasi dan perfusi darah paru. Akibatnya, ada bagian-bagian aliran darah paru yang mengalami hipoksia serta cenderung

menghambat pembuangan CO_2 . Hiperventilasi merupakan respons awal terhadap meningkatnya penutupan jalan napas, sehingga tekanan parsial CO_2 (PaCO_2) dalam darah arteri sering di bawah nilai normal (40 mmHg) sesuai keparahan asma. Karena itu, peningkatan kadar PaCO_2 menandai bahwa sudah terjadi penyumbatan stadium lanjut dan berbahaya. Selain itu, tidak ada kompensasi terhadap defisiensi pengambilan CO_2 yang berakibat nilai PaO_2 menurun. Akhirnya, ventilasi tidak cukup untuk kebutuhan metabolisme sistem pernapasan. Turbulensi arus udara dan getaran mukus bronkus menyebabkan bunyi mengi (suara seperti bersiul) yang terdengar ketika serangan asma.



Gambar 2.9 Perbandingan bronkus pada individu normal dan penderita asma (Robbins *et al.*, 2003)

2.2.5 Peran Limfosit pada Asma

Banyak bukti yang menunjukkan bahwa ada respons yang berbeda antara sel Th1 dan Th2 dan bahwa respons sel Th2 berkaitan erat dengan alergi.

Pada respons sel Th1 akan dihasilkan IL-2, INF- γ dan TNF- β yang mengaktivasi makrofag yang terlibat pada Reaksi Hipersensitivitas Tipe Lambat (*Delayed Type Hypersensitivity*). Sedangkan respons sel Th2 menghasilkan IL-4, IL-5, IL-10 dan IL-13 yang bertanggung jawab atas respons antibodi, termasuk produksi IgE dan menghambat produksi makrofag. Polarisasi respons imun spesifik Th1 dan Th2 berasal dari prekursor sel Th yang berkembang ke arah predominan sel Th1 atau Th2 atas pengaruh faktor genetik dan lingkungan pada tingkat presentasi antigen. Sel T CD4⁺ pertama berkembang dahulu menjadi sel Th0 yang menghasilkan profil sitokin yang tidak selalu sama, tetapi bila stimulasi antigen berlanjut, terjadi polarisasi ke arah sel Th1 atau Th2, masing-masing memproduksi sitokin tertentu.

Faktor genetik dan lingkungan mempengaruhi diferensiasi sel Th1/Th2 dengan menentukan predominansi sitokin tertentu dalam lingkungan mikro tempat sel bersangkutan diaktivasi. Adanya IL-4 sejak awal lingkungan mikro merupakan rangsangan kuat untuk berkembang ke arah Th2 sedangkan IL-12 dan IFN dalam lingkungan mikro menyebabkan perkembangan ke arah Th1. Mekanisme yang bertanggung jawab atas produksi IL-4 awal maupun sumber IL-4 belum diketahui, tetapi sel Th naif sendiri ternyata dapat memproduksi sejumlah kecil IL-4 sejak awal stimulasi. Selain itu, faktor penting lain yang berpengaruh pada diferensiasi sel Th1/Th2 adalah ligasi TCR (*T-Cell Receptor*), sinyal yang diberikan oleh interaksi CD40-CD40L dan molekul ko-stimulator B7-CD28. Sinyal kostimulasi meningkatkan ekspresi IL-4 pada saat pengenalan dan meningkatkan diferensiasi sel T CD4 naif menjadi sel efektor yang memproduksi IL-4. Kemudian faktor yang berperan dalam polarisasi sel Th1/Th2 adalah faktor transkripsi (Kresno, 2010). Profil sitokin yang diproduksi sel T CD4⁺ pada

penyakit alergi dan nonalergi dipengaruhi oleh jenis dan dosis antigen, jenis APC, sitokin dalam lingkungan mikro, sinyal kostimulasi yang diterima oleh sel T dan *host factor* khususnya faktor genetik. Sehingga, profil sitokin dan fungsi sel T CD4⁺ tidak ditentukan sebelumnya melainkan bergantung pada bagaimana sel itu distimulasi oleh antigen.

Berbagai penelitian membuktikan bahwa sebagian sel Th2 dapat berfungsi sebagai sel regulator untuk menekan repons imun dan karena sebagian produk sel Th2, seperti TGF- β mempunyai sifat supresor yang potensial, ada kemungkinan bahwa sel Th2 yang berfungsi sebagai regulator/supresor berbeda dengan sel Th2 konvensional. Salah satu sel T-Regulator yang dikenal adalah sel T-reg CD4⁺CD25⁺. T-regulator diketahui menghambat baik sel Th1 maupun Th2. Dilaporkan bahwa penurunan jumlah sel limfosit T-regulator pada pasien dengan penyakit alergi dibandingkan dengan individu yang menunjukkan kadar IgE dan jumlah eosinofil tinggi tetapi asimtomatik (Kresno, 2010). Limfosit T-regulator berfungsi menekan awalan penyakit alergi dan menekan sel-sel sistem imun yang lain di samping menekan sel Th1 dan Th2. Berbagai penelitian juga melaporkan bahwa pola pewarisan penyakit alergi tidak mengikuti konsep Mendel, tetapi mengikuti konsep multigenik yang kompleks. Sel T-regulator CD4⁺CD25⁺ mengekspresikan *forkhead box transcription factor* (FOXP3) yang berperan sebagai "master-regulator" perkembangan dan fungsi T-regulator (Mohammed *et al.*, 2011). Defek atau tidak adanya FOXP3 pada manusia berasosiasi dengan abnormalitas imun, seperti alergi berat dan tingginya kadar IgE (Mohammed *et al.*, 2011). Beberapa studi, dengan mengukur level mRNA, menunjukkan bahwa FOXP3 terekspresi

dalam patogenesis asma. Kadar protein FOXP3 intraselular dapat diperiksa menggunakan antibodi anti-FOXP3 (Mohammed *et al.*, 2011).

2.2.6 Faktor Risiko Asma Bronkial

Menurut laporan *Global Initiative for Asthma* tahun 2011, faktor-faktor yang mempengaruhi perkembangan dan terjadinya asma terbagi menjadi dua, yaitu *host factor* atau faktor pejamu (genetik) dan faktor lingkungan.

1. Faktor pejamu (genetik)

a. Atopi/alergi

Individu dengan penyakit alergi biasanya mempunyai keluarga dekat yang juga alergi. Hal ini biasa disebut bakat alergi pada suatu individu. Adanya bakat alergi ini membuat individu tersebut mudah terkena asma bronkial jika terjadi paparan dengan faktor pencetus. Tidak diketahui mekanisme pasti penurunannya.

b. Hiperreaktivitas bronkus

Saluran napas yang sensitif terhadap berbagai rangsangan alergen maupun iritan.

c. Jenis kelamin

Pada anak laki-laki dibawah usia 14 tahun insiden asma lebih tinggi dibandingkan anak perempuan. Namun pada saat dewasa, perbandingan tersebut menjadi kurang-lebih sama dan pada perempuan menopause insiden asma lebih meningkat.

d. Ras/etnis

Ras kulit hitam (negro) dan hispanik lebih suseptibel terhadap asma.

e. Obesitas

Peningkatan *Body Mass Index* (BMI) menjadi faktor risiko asma. Mediator tertentu semisal leptin, dapat mempengaruhi saluran asma namun mekanisme pasti dari hal tersebut belum diketahui.

2. Faktor lingkungan

a. Alergen dalam rumah

Debu, tungau, spora jamur, serpihan kulit hewan, bulu hewan seperti kucing dan anjing menjadi faktor pencetus timbulnya asma.

b. Alergen luar rumah

Serbuk sari dari bunga atau tanaman tertentu dapat menyebabkan timbulnya asma. Pada negeri dengan 4 musim, khususnya pada musim semi, serbuk bunga berterbangan di udara dan mengakibatkan meningkatnya serangan asma pada musim tersebut.

3. Faktor lain

a. Alergen makanan

Contoh: susu, telur, hewan laut, coklat, kacang, gandum, bahan penyedap, bahan pengawet makanan.

b. Alergen obat-obatan tertentu

Contoh: penisilin, sefalosporin, etritrosin, tetrasiklin, analgesik, antipiretik.

c. Bahan iritan

Contoh: bahan-bahan industri dan rumah tangga, parfum.

d. Asap rokok

e. Polusi udara dalam maupun luar ruangan

f. Perubahan cuaca

Cuaca yang mendadak dingin menjadi faktor pemicu asma.

g. Emosi yang berlebihan (stress)

h. Asma yang dipicu oleh olahraga

i. Status ekonomi.

2.2.7 Diagnosis Asma Bronkial

Gejala klinis asma yang sangat bervariasi, seringkali membuat asma tidak terdiagnosis, terlebih pada gejala yang sifatnya episodik. Maka dari itu, diperlukan suatu pemeriksaan yang holistik dan komprehensif. Diagnosis asma dilakukan dengan anamnesis dan pemeriksaan klinis dan laboratorium.

2.2.7.1 Anamnesis

Pemeriksaan asma diawali dengan anamnesis yang baik mengenai riwayat penyakit/gejala amat penting. Gejala-gejala yang paling sering adalah sesak napas, batuk, mengi, rasa berat di dada, yang semua itu bervariasi terhadap cuaca. Beberapa hal yang perlu ditanyakan adalah gejala yang sifatnya episodik; dapat sembuh sendiri dengan atau tanpa pengobatan, gejala memburuk di malam atau dini hari, diawali faktor pencetus yang diketahui, berespons terhadap pemberian bronkodilator, riwayat keluarga (atopi), riwayat alergi, penyakit lain yang menberatkan dan perkembangan penyakit dan pengobatan.

2.2.7.2 Pemeriksaan Fisik

Pada pemeriksaan fisik terdapat perubahan cara bernapas dan anatomi toraks. Pada inspeksi ditemukan takipneu, sesak, penggunaan otot bantu pernapasan di leher, perut dan dada. Terkadang ditemukan pula sianosis, gelisah, sukar bicara. Pada auskultasi dada ditemukan bunyi *wheezing* (mengi) dan ekspirasi yang memanjang. Pada auskultasi dapat pula ditemukan takikardi.

2.2.7.3 Pemeriksaan Penunjang

Pemeriksaan ini dilakukan untuk menilai obstruksi jalan napas, reversibilitas kelainan fungsi paru dan variabilitas fungsi paru. Fungsi paru diperiksa dengan beberapa metode, yaitu menggunakan spirometri untuk menilai FEV1, menggunakan *peak expiratory flow meter* (PEF) untuk menilai arus puncak respirasi, radiologi dengan foto polos dada, uji provokasi bronkus, dan pengukuran status alergi seperti pengukuran kadar IgE dan *skin prick test*.

Diagnosis banding yang mungkin adalah penyakit paru obstruktif kronis, bronkitis kronik, gagal jantung kongestif, batuk kronis, disfungsi laring, obstruksi mekanis (tumor), emboli paru. Sedangkan pada anak-anak adalah benda asing di saluran napas, laringotrakeomalasia, limfadenopati, tumor, stenosis trakea dan bronkiolitis.

2.2.8 Klasifikasi Asma Bronkial

Rengganis pada tahun 2008 membagi asma berdasarkan etiologi, derajat berat, gejala, dan kontrol asma.

1. Klasifikasi menurut etiologi

Klasifikasi ini didapatkan berdasarkan bahan yang mensitisasi. Namun hal ini sulit dilakukan antara lain karena bahan alergen tersebut seringkali tidak diketahui.

2. Klasifikasi menurut derajat berat asma

Klasifikasi ini penting untuk menentukan obat yang diperlukan pada awal penanganan asma. Derajat berat ini dibagi menjadi intermitten, persisten ringan, persisten sedang dan persisten berat.

3. Klasifikasi kontrol asma

Seperti yang dipaparkan dalam laporan *Global Initiative for Asthma* tahun 2011, yaitu asma terbagi dalam 3 kategori; terkontrol, sebagian terkontrol dan tidak terkontrol. Masing-masing kategori ini memiliki lima indikator penilaian yaitu: gejala saat siang hari, keterbatasan aktivitas, gejala saat malam hari, perlu penggunaan *reliever*, dan fungsi paru (PEF atau FEV1). Pembagian kategori ini mempengaruhi cara menatalaksanaannya.

2.2.9 Eksaserbasi Asma Bronkial

Eksaserbasi asma adalah episode akut atau subakut dengan sesak yang memburuk secara progresif dan disertai batuk, mengi, nyeri dada ataupun kombinasi gejala-gejala tersebut. Eksaserbasi ditandai dengan menurunnya arus napas yang dapat diukur secara objektif menggunakan spirometri atau PEF. Penderita asma terkontrol dengan steroid inhaler memiliki risiko lebih kecil untuk eksaserbasi (Rengganis, 2008). Meskipun demikian, individu tersebut tetap dapat mengalami

eksaserbasi mengalami eksaserbasi, seperti pada kondisi infeksi virus saluran napas.

2.2.10 Pencegahan Asma Bronkial

Terdapat 2 prinsip pencegahan asma yaitu pertama, mencegah sensitisasi ataupun pencegahan pencetus pada individu yang disensitisasi. Paparan terhadap alergen-alergen potensial perlu dihindari pada pencegahan ini. Kedua, yaitu pencegahan eksaserbasi asma. Eksaserbasi dapat dipicu oleh bermacam alergen baik dalam ataupun luar rumah. Kendati sulit, pencegahan paparan terhadap alergen tersebut dapat mencegah eksaserbasi.

2.2.11 Pengobatan Asma Bronkial

Tujuan pengobatan asma yaitu menghilangkan dan mengendalikan gejala asma agar kualitas hidup meningkat, mencegah eksaserbasi akut, meningkatkan ataupun mempertahankan fungsi paru, menghindari efek samping obat, serta mencegah kunjungan gawat darurat.

Menurut Pedoman Pengendalian Penyakit Asma di Indonesia Depkes RI tahun 2009, terapi pada asma terdiri atas obat pelega (reliever) yang digunakan ketika muncul serangan yang akut dan obat pengontrol (controller) untuk asma kronis yang diberikan dalam jangka panjang dan terus menerus.

2.2.11.1 Pengobatan Asma Akut

Pada fase ini digunakan golongan obat pelega yaitu obat-obatan yang dapat merelaksasai bronkokonstriksi dan gejala-gejala akut yang menyertainya

dengan segera. Termasuk dalam golongan ini yaitu agonis β -2 kerja cepat inhalasi (salbutamol), antikolinergik inhalasi (ipatropium bromida), metylxantin (teofilin) dan kortikosteroid sistemik (prednison). Peran kortikosteroid sistemik pada asma akut adalah untuk mencegah perburukan gejala lebih lanjut.

2.2.11.2 Pengobatan Asma Kronis

Penderita asma kronik diharapkan diharapkan dapat mengetahui kondisi kronik dan variasi keadaan asma serta dapat melakukan penanganan asma secara mandiri. Antiinflamasi merupakan terapi yang digunakan untuk mengontrol asma dan mencegah serangan. Obat-obatan ini dipakai setiap hari. Adapun obat pengontrol asma tersebut yaitu antara lain agonis β -2 kerja lama (salmeterol), antileukotrien (zafirlukast), natrium kromolin dan kortikosteroid inhalasi (budesonide). Agen adrenergik seperti agonis β -2 menjadi obat antiasma yang paling banyak digunakan. Obat tersebut menunjukkan efek adrenergik- β , terutama melemaskan otot polos saluran napas dengan efek yang minimal terhadap jantung yang lebih kecil. Namun efek tersebut dapat menyebabkan tremor otot, mengantuk dan stimulasi psikomotor (Price and Wilson, 2002). Berdasarkan pedoman asma dari *Global Initiative for Asthma* tahun 2011, terapi pilihan untuk mengatasi serangan akut asma adalah agonis β -2 kerja cepat inhalasi yang melegakan konstiksi bronkus dan sebagai pre-medikasi konstiksi bronkus yang diinduksi aktifitas fisik, baik untuk anak-anak maupun orang dewasa di segala usia. Untuk pengobatan jangka panjang, dipilih antiinflamasi karena perbaikan fungsi paru serta penurunan reaktivitas bronkus lebih baik dibandingkan bronkodilator. Terapi pengontrol (jangka panjang) yang paling efektif saat ini adalah kortikosteroid inhalasi (GINA, 2011). Tetapi, pemakaian steroid dalam jangka panjang terlebih lagi dalam dosis tinggi akan menimbulkan

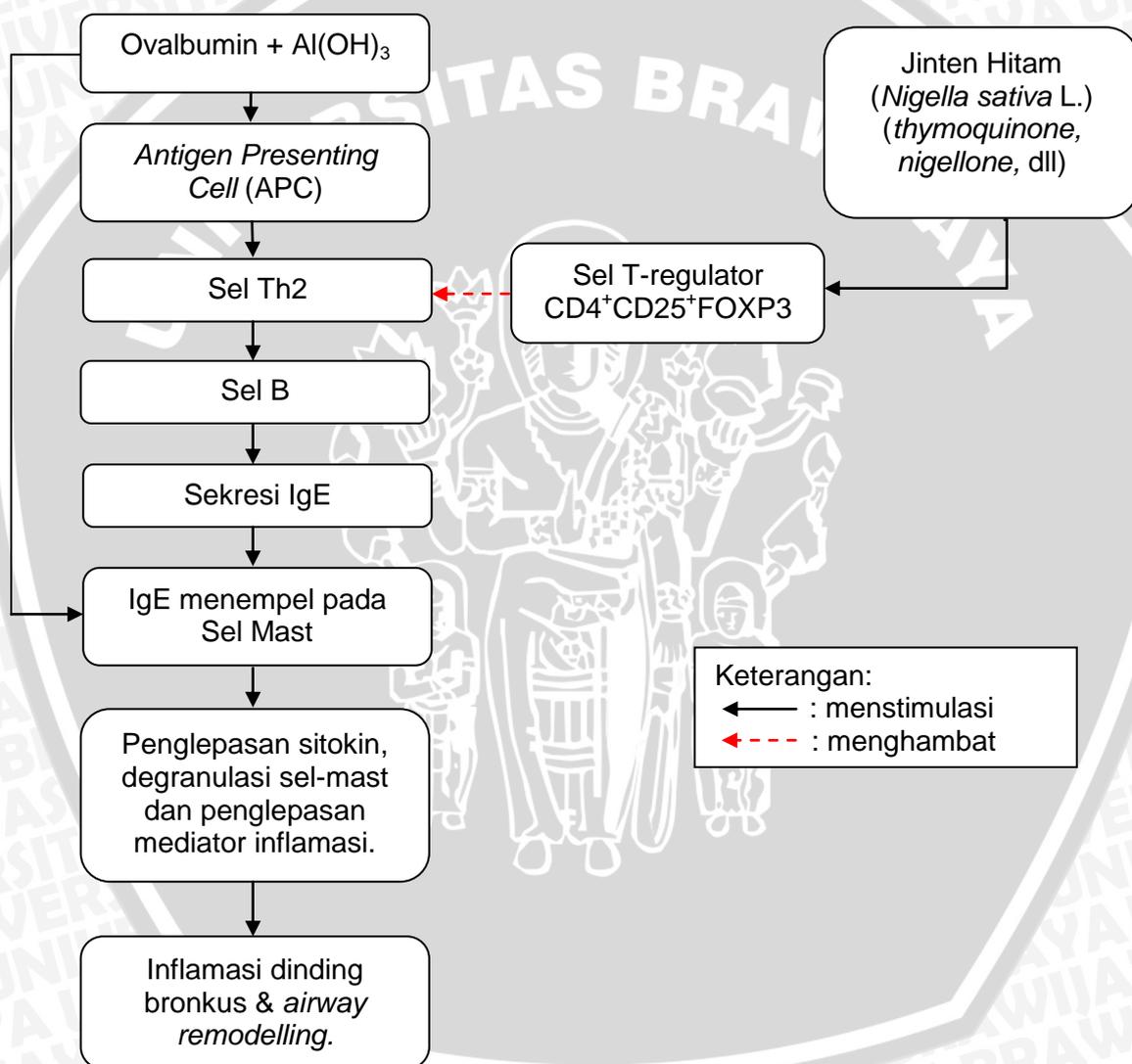
efek samping sistemik, seperti supresi adrenal, osteoporosis, katarak dan glaukoma (GINA, 2011).



BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka konsep penelitian



Paparan antigen, dalam hal ini sensitisasi oleh ovalbumin dan *adjuvant* aluminium hidroksida ($\text{Al}(\text{OH})_3$) akan menginduksi alergi melalui serangkaian proses imunologi, yaitu ditangkapnya antigen oleh APC yang kemudian disajikan kepada sel limfosit Th2, lalu Th2 akan menstimulasi sel B dengan sitokin IL-4 untuk memproduksi IgE, yang kemudian menempel pada sel mast. Paparan ulang antigen pada IgE di permukaan sel mast akan mengalami reaksi silang dan menimbulkan degranulasi sel mast, yaitu pelepasan mediator-mediator inflamasi seperti histamin, leukotrien, heparin dan kemokin lainnya yang nantinya akan menyebabkan perubahan morfologi dinding bronkus (*airway remodelling*). Sel Th2 dapat disupresi oleh sel T-regulator $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FOXP3}$. Jinten hitam (*Nigella sativa* L.) yang mengandung komponen-komponen seperti *thymoquinone*, *nigellone* dan sebagainya, terbukti memiliki efek imunomodulator (Ali dan Blunden, 2003). Sehingga, ada kemungkinan bahwa jinten hitam dapat menstimulasi T-regulator $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FOXP3}$.

3.2 Hipotesis

1. Ekstrak jinten hitam (*Nigella sativa* L.) dapat mempengaruhi jumlah sel limfosit T-regulator $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FOXP3}$ pada paru model mencit asma.
2. Peningkatan dosis ekstrak jinten hitam (*Nigella sativa* L.) dapat meningkatkan jumlah sel limfosit T-regulator $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FOXP3}$ pada paru model mencit asma.
3. Ekstrak jinten hitam (*Nigella sativa* L.) memiliki dosis optimal yang dapat meningkatkan jumlah sel limfosit T-regulator $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FOXP3}$ pada paru model mencit asma.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental*) yang dilakukan di laboratorium secara *in vivo* dengan menggunakan rancangan percobaan *Post Test Only Control Group Design*. Penelitian yang dilakukan menggunakan hewan coba berupa mencit galur *BALB/c* yang dibagi menjadi lima kelompok; tiga kelompok perlakuan yang diberikan ekstrak jinten hitam dalam berbagai dosis, satu kelompok kontrol positif, dan satu kelompok kontrol negatif.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Pemilihan Sampel

Sampel pada penelitian ini adalah mencit putih (*Mus musculus L.*) betina galur *BALB/c* yang diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gajah Mada, Yogyakarta yang kemudian dipelihara di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang, Jawa Timur. Pemilihan mencit tersebut dikarenakan mencit merupakan hewan yang mudah dipelihara dan ditangani.

4.2.1.1 Kriteria Inklusi

1. Mencit betina karena memiliki respon alergen yang lebih baik dibandingkan mencit jantan (Epstein, 2004).
2. Mencit berbulu warna putih, sehat, bergerak aktif, dan tingkah laku normal.

3. Mencit berumur 8-12 minggu (dewasa) sehingga sistem imun sudah matang dan sel limfosit Th dapat diamati dengan baik (Epstein, 2004).
4. Mencit memiliki berat badan rata-rata lebih dari 25 gram.

4.2.1.2 Kriteria Eksklusi

1. Mencit yang selama penelitian tidak mau makan.
2. Mencit yang kondisi fisiknya menurun atau mati selama penelitian berlangsung.

4.2.2 Jumlah Sampel

Hewan coba dibagi dalam lima kelompok. Lima kelompok tersebut merupakan tiga kelompok perlakuan yang diberikan ekstrak jinten hitam dalam berbagai dosis, satu kelompok kontrol positif dan satu kelompok kontrol negatif. Jumlah sampel yang digunakan menggunakan rumus: $p(n-1) \geq 15$ (Solimun, 2001).

p : jumlah perlakuan

n : jumlah sampel

15 : nilai konstanta

Pada penelitian ini, $t=5$ sehingga jumlah sampel adalah:

$$P(n-1) \geq 15$$

$$Pn-p \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$n \geq 4$$

Untuk perlakuan sebanyak 5 kelompok, diperlukan pengulangan minimal 4 kali untuk masing-masing perlakuan. Sehingga total sampel dibutuhkan sejumlah 20 ekor tikus yang diambil secara *purposive sampling* dengan rincian 4 ekor tikus untuk masing-masing kelompok perlakuan. Sebelum pengelompokan, dilakukan aklimatisasi selama 2 minggu.

Penelitian ini membagi sampel menjadi lima kelompok perlakuan secara acak (*randomized*), yaitu:

1. Kelompok kontrol negatif (P0) : Sampel dengan diet normal tanpa diberikan ekstrak jinten hitam.
2. Kelompok kontrol positif (P1): Sampel dengan diet ovalbumin dan aluminium hidroksida tanpa diberikan jinten hitam.
3. Kelompok perlakuan 1 (P2) : Sampel dengan diet (OVA+Al(OH)₃) + ekstrak jinten hitam dosis 0.024 ml/ekor.
4. Kelompok perlakuan 2 (P3): Sampel dengan diet (OVA+Al(OH)₃) + ekstrak jinten hitam dosis 0.048 ml/ekor.
5. Kelompok perlakuan 3 (P4): Sampel dengan diet (OVA+Al(OH)₃) + ekstrak jinten hitam dosis 0.096 ml/ekor.

4.3 Variabel Penelitian

Pada penelitian ini, variabel dibagi menjadi dua, yaitu:

1. Variabel Bebas :
 - a. Ovalbumin
 - b. Jinten hitam
1. Variabel Terikat

- a. Jumlah sel limfosit T-regulator CD4⁺CD25⁺FOXP3 pada paru model mencit (*Mus musculus* L.) asma yang diperiksa dengan metode *flow cytometry*.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Pemeliharaan hewan coba dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang, Jawa Timur. Pemeriksaan dan penghitungan jumlah sel limfosit T-regulator CD4⁺CD25⁺FOXP3 dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang, Jawa Timur. Penelitian ini dilakukan dalam jangka waktu 9 minggu, dimulai dari bulan Oktober – Desember 2010.

4.5 Instrumen Penelitian

4.5.1 Alat

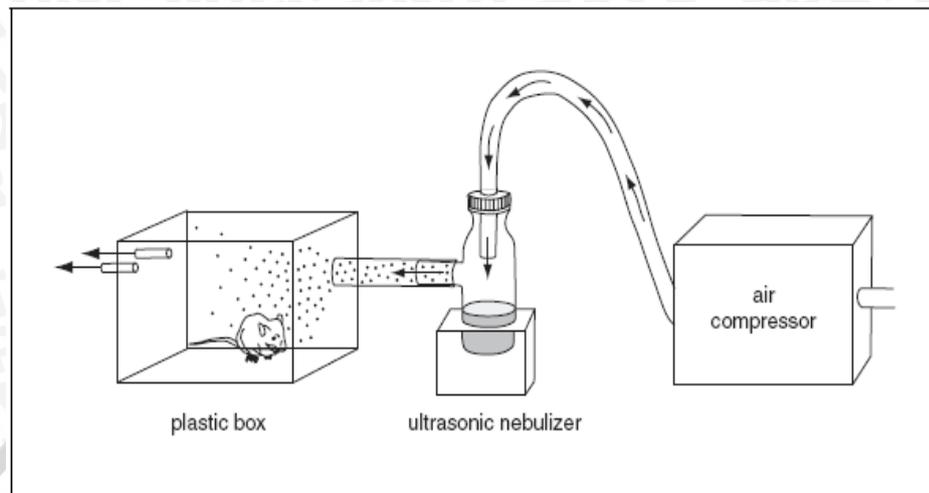
4.5.1.1 Alat Ekstraksi Jinten Hitam

1. Oven
2. Blender
3. Timbangan (1)
4. Gelas erlenmeyer (2)
5. *Shaker machine*, untuk mencampur jinten hitam dan etanol teknis agar kandungan minyak jinten hitam larut dalam pelarutnya.
6. Corong gelas (1)
7. Kertas saring (1)
8. Labu evaporator (1)
9. Labu penampung etanol (1)
10. Evaporator (1)

11. Pendingin spiral/rotary evaporator (1)
12. Selang water pump
13. Water pump
14. Water bath
15. Vacuum pump
16. Botol plastik (3), sebagai wadah penyimpanan ekstrak jinten hitam yang siap diberikan kepada mencit. Setiap dosis ekstrak diperlukan satu botol yang diberi label dosis.

4.5.1.2 Alat untuk Perlakuan

1. *Spuut* 1 ml untuk menyuntikkan NaCl 0.9%, ovalbumin dan aluminium hidroksida secara intraperitonia.l
2. *Nebulizer* merek OMRON tipe NU-017 untuk sensitisasi mencit secara inhalasi.
3. Kotak berukuran 30 cm x 30 cm yang dapat dihubungkan dengan *nebulizer* melalui selang untuk tempat mencit ketika dilakukan sensitisasi inhalasi.
4. *Spuut* 3 ml dan 5 ml untuk memasukkan NaCl 0.9% atau ovalbumin dan aluminium hidroksida ke dalam *nebulizer*.
5. Sonde 0.5 ml untuk memasukkan ekstrak jinten hitam ke dalam lambung mencit. Untuk keperluan ini, ujung sonde dibuat atraumatis.



Gambar 4.1 Ilustrasi instrumen sensitisasi inhalasi pada hewan coba

4.5.1.3 Alat Pemeliharaan Mencit

1. Kandang mencit
2. Penutup kandang dari anyaman kawat
3. Botol air minum mencit

4.5.1.4 Alat Pembedahan Mencit

1. Alat bedah minor
2. Sarung tangan
3. Tempat organ

4.5.1.5 Alat untuk Pemeriksaan

1. Jarum dan *sprit*
2. Mikropipet
3. *Vacutainer*
4. *Cell strainer*
5. Gelas, botol, silinder, vial, mortar

6. *Microtube*
7. Alat dan box pendingin
8. Alat *flow cytometry* merek BD FACSCalibur
9. Alat sentrifugasi merek Hettich Mikro 22R
10. Kalkulator statistik

4.5.2 Bahan

4.5.2.1 Hewan Coba

Dalam penelitian ini dipakai hewan coba mencit putih (*Mus musculus* L.) galur *BALB/c* berjenis kelamin betina, berusia 8-12 minggu (saat awal perlakuan), dengan berat badan sekitar 20-40 gram (diukur saat awal dan akhir penelitian) dengan kondisi bebas penyakit yang terlihat dari gerakannya yang aktif dan diet bebas ovalbumin. Hewan coba diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Universitas Gajah Mada, Yogyakarta. Hewan coba dipelihara dalam kandang berukuran 30 cm x 30 cm x 20 cm dan diisi 10 ekor setiap kandangnya.

4.5.2.2 Bahan untuk Perlakuan

1. Ovalbumin (OVA)
2. Aluminium hidroksida (alum) sebagai *adjuvant* OVA.
3. NaCl 0.9%
4. Jinten hitam sebagai bahan utama ekstraksi
5. Etanol teknis (96%) sebagai pelarut ekstraksi
6. Akuades
7. Makanan mencit
8. Air matang untuk minum mencit

4.5.2.3 Bahan untuk Pemeriksaan

1. Larutan PBS 20%
2. Kit pemeriksaan *flow cytometry* sel limfosit T-reg CD4⁺CD25⁺FOXP3

4.6 Definisi Operasional

4.6.1 Mencit Galur BALB/c

Mencit yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit galur *BALB/c* yang dibeli dari LPPT-UGM Yogyakarta. Mencit yang dipilih merupakan mencit betina dengan berat badan lebih dari 20 gram, umur 8-12 minggu, sehat dan masih dalam keadaan fertil dan tidak terinfeksi.. Pakan yang diberikan selama penelitian adalah pakan khusus yang komposisinya sama dengan pakan babi. Air minumnya adalah air matang. Kandang dibersihkan setiap 2 minggu sekali. Sebelum diberikan kepada mencit, pakan dan sekam disterilisasi menggunakan autoklaf terlebih dahulu.

4.6.2 Jinten Hitam

Jinten hitam yang digunakan berasal dari Kota Batu dan telah disertifikasi oleh Balai Materia Medika, Batu, Malang, Jawa Timur. Dosis ekstrak yang diberikan adalah 0.024 ml/ekor untuk kelompok 1, 0.048 ml/ekor untuk kelompok 2 dan 0.096 ml/ekor untuk kelompok 3.

4.6.3 Pemberian Ovalbumin dan Aluminium Hidroksida

Mencit disensitisasi menggunakan ovalbumin (OVA) dan aluminium hidroksida. Ovalbumin adalah komponen utama putih telur

unggas dengan berat molekul sekitar 45 kDa (Yamasaki *et al.*, 2003). Ovalbumin adalah alergen standar yang digunakan pada banyak penelitian untuk menimbulkan sensitisasi jalan napas pada hewan coba (Hamelmann and Gelfand, 1999). Ovalbumin yang digunakan dalam penelitian ini adalah ovalbumin merek SERVA yang merupakan *albumin egg lyophil* yang bebas garam dan bebas *lysozyme* yang diproduksi oleh SERVA Elektroforesis GmbH.

Aluminium hidroksida (alum) digunakan sebagai adjuvant yang membuat efek alergen ovalbumin meningkat dan sensitisasi berlangsung lebih lama (Hemelmann and Gelfand, 1999). Dosis albumin yang diberikan adalah 10 ug OVA = 1 mg Al(OH)₃ yang dilarutkan dalam 0.5 ml NaCl 0.9% pada sensitiasi secara intraperitoneal dan OVA 1% dalam NaCl 0.9% sebanyak 8 ml setiap perlakuan pada sensitisasi inhalasi.

4.6.4 Sel Limfosit T-regulator CD4⁺CD25⁺FOXP3

Sel limfosit T-regulator CD4⁺CD25⁺FOXP3 diperiksa dari sampel darah menggunakan *flow cytometry* dengan anti-mouse yang sudah terkonjugasi dengan pelabelan warna, yaitu anti-mouse CD4⁺-Fluorescein Isothiocyanate (FITC), anti-mouse CD25⁺-PerCP, dan untuk FOXP3 intrasel diberi anti-mouse FOXP3-PE.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Cara Kerja

4.7.1.1 Aklimatisasi

Aklimatisasi (penyesuaian lingkungan) bagi hewan uji dilakukan selama 2 minggu di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang, Jawa Timur. Selama 14 hari ini, mencit hanya diberi makan dan minum standar laboratorium secara *ad libitum*.

4.7.2 Ekstraksi Jinten Hitam

4.7.2.1 Proses Pengeringan

Jinten hitam dicuci hingga bersih kemudian dioven pada suhu 80°C hingga benar-benar kering.

4.7.2.2 Proses Ekstraksi

1. Jinten hitam dihaluskan dengan menggunakan blender hingga benar-benar halus.
2. Jinten hitam yang telah halus ditimbang sebanyak 100 gram, lalu dimasukkan ke dalam gelas erlenmeyer ukuran 1 liter.
3. Jinten hitam tersebut lalu direndam dengan etanol hingga 900 ml.
4. Kocok campuran tersebut dengan *shaker machine* hingga benar-benar tercampur (kurang lebih 30 menit).
5. Kemudian didiamkan selama 1 malam hingga mengendap.

4.7.2.3 Proses Evaporasi

1. Ambil lapisan atas etanol dengan zat aktif yang telah diambil, kemudian dimasukkan dalam gelas erlenmeyer 1 liter.
2. Labu evaporasi dipasang pada evaporator.

3. *Water bath* diisi dengan air hingga penuh.
4. Semua rangkaian alat dipasang, termasuk *rotary evaporator*, pemanas *water bath* (atur hingga 90°C), lalu disambungkan dengan aliran listrik.
5. Biarkan larutan etanol terpisah dengan zat aktif yang sudah berada dalam labu.
6. Tunggu sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung (1,5 – 2 jam untuk 1 labu).
7. Hasil ekstraksi dimasukkan ke dalam botol plastik, lalu disimpan di dalam *freezer*.
8. Hasil ekstraksi inilah yang akan digunakan dalam penelitian. Ekstrak jinten hitam ini berupa cairan yang berminyak kental dan berwarna coklat tua kehitaman sebanyak 100 ml. Konsentrasi ekstrak ini adalah 100 g/100 ml atau 1 g/ml.

4.7.3 Perhitungan Dosis Jinten Hitam

Perhitungan dosis jinten hitam didasarkan pada dosis untuk manusia (Rakhmatiar, 2009).

Dosis pada manusia: 1-2 sendok teh/hari/manusia

3-6 g/hari/50 kg (rata-rata berat badan)

0.06 – 0.12 g/kgBB/hari

Dosis pada mencit: 10-3 x dosis manusia

10 x → 0.6 – 1.2 g/kgBB/hari

30 x → 1.8 – 3.6 g/kgBB/hari

Dosis awal diambil dari dosis terkecil kemudian berturut-turut diambil kelipatannya sehingga didapatkan 3 dosis sebagai berikut:

Dosis 1 = 1,2 g/kgBB/hari

Dosis 2 = 2.4 g/kgBB/hari

Dosis 3 = 4.8 g/kgBB/hari

1 ml jinten = 1000 μ l

1 ml = 1000 mg

1 gram = 1000 mg

1 sonde = 0.5 ml/ekor

Berdasarkan perhitungan di atas, jumlah pemberian ekstrak jinten hitam berdasarkan dosis tersebut pada mencit dengan berat rata-rata 20 gram adalah sebagai berikut:

Dosis 1 (kelompok 3) = 1,2 g/kgBB/hari
= 0,024 ml/ hari

Dosis 2 (kelompok 4) = 2,4 g/kgBB/hari
= 0,048 ml/ hari

Dosis 3 (kelompok 5) = 4,8 g/kgBB/hari
= 0,096 ml/ hari

4.7.4 Pembagian Kelompok Perlakuan

Mencit dibagi menjadi lima kelompok perlakuan yang terdiri dari satu kelompok kontrol negatif, satu kelompok kontrol positif dan tiga

kelompok perlakuan. Masing-masing kelompok terdiri dari lima ekor mencit.

Tabel 4.1 Kelompok dan jenis perlakuan

Kelompok Perlakuan	Jenis Perlakuan
1. Kontrol negatif	Tanpa dipapar ovalbumin+Al(OH) ₃ dan tanpa diberi ekstrak jinten hitam
2. Kontrol positif	Dilakukan sensitisasi ovalbumin+Al(OH) ₃ saja selama 9 minggu
3. Kelompok 1	Dilakukan sensitisasi saluran nafas dan diberi ekstrak jinten hitam per oral dosis 1,2 g/kgBB/hari selama 9 minggu
4. Kelompok 2	Dilakukan sensitisasi saluran nafas dan diberi ekstrak jinten hitam per oral dosis 2,4 g/kgBB/hari selama 9 minggu
5. Kelompok 3	Dilakukan sensitisasi saluran nafas dan diberi ekstrak jinten hitam per oral dosis 4,8 g/kgBB/hari selama 9 minggu

4.7.5 Sensitisasi Mencit

4.7.5.1 Sensitisasi Intraperitoneal

Sensitisasi awal dilakukan secara intraperitoneal dengan menyuntikkan campuran 10 µg ovalbumin (OVA)+1 mg Al(OH)₃ yang dilarutkan dalam 0,5 cc NaCl 0.9% pada hari ke-0 dan hari ke-14 (Barlianto dkk, 2009).

4.7.5.2 Sensitisasi Inhalasi

Sensitisasi ulangan dilakukan secara inhalasi dengan memberikan ovalbumin (OVA) 1% dalam NaCl 0,9% sebanyak 7 ml per perlakuan dengan menggunakan *nebulizer* ultrasonik merek OMRON tipe NU-017 selama 20 menit dengan volume laju udara dan volume nebulisasi pada skala 1. Sensitisasi secara inhalasi tersebut diulang selama 6 minggu sesuai jadwal dan pada waktu yang sama tiap perlakuan.

Prosedur sensitisasi secara inhalasi adalah sebagai berikut:

1. Semua bagian *nebulizer* (*cup*, tutup, dll) kecuali plat dari logam dibersihkan dengan alkohol, kemudian dikeringkan.
2. Selang dibersihkan dengan cara disiram dengan air steril, kemudian digantungkan hingga kering.
3. Tempat air pada *nebulizer* diisi dengan air steril hingga mencapai *water level*, setelah sebelumnya pembuangan dicek terlebih dahulu dan dipastikan telah ditutup agar tidak mengalir keluar.
4. *Cup* dipasang pada tempatnya. Setelah itu semua mencit dalam 1 kelompok perlakuan dimasukkan ke dalam kotak yang akan terhubung dengan *nebulizer*.
5. NaCl 0,9% atau ovalbumin dimasukkan ke dalam cup dengan menggunakan *sprit* tanpa jarum.
6. Tutup dipasang dan dikunci, kemudian selang dipasang, dalam hal ini selang dipasang sedemikian rupa hingga tidak sampai tertekuk, lalu selang dihubungkan dengan kotak mencit.

7. Kabel *nebulizer* dihubungkan dengan sumber listrik. Kemudian *nebulizer* diaktifkan dan diperiksa apakah terdapat indikator eror yang harus diperbaiki. Kemudian dilakukan pengaturan tombol waktu, volume aliran udara dan volume nebulisasi. Bila semua telah dilakukan maka proses sensitisasi inhalasi dapat dimulai.
8. Setelah proses tersebut selesai, dinonaktifkan lalu mencit dikeluarkan dari kotak dan dikembalikan ke kandangnya.
9. *Nebulizer* dibersihkan sesuai prosedur 1-2 setiap selesai perlakuan dan sebelum perlakuan berikutnya. Air steril diganti setiap 1 kali dalam seminggu.

4.7.6 Pemberian Ekstrak Jinten Hitam

Pemberian ekstrak jinten hitam dilakukan setiap hari secara *forced feeding* dengan menggunakan *sprit* yang pada ujungnya dibuat atraumatis (ditumpulkan dengan platina) dan dimasukkan melalui mulut mencit. Ekstrak jinten hitam yang diberikan sebanyak 0,024 ml/ekor pada kelompok dosis 1, 0,048 ml/ekor pada kelompok dosis 2 dan 0,096 ml/ekor pada kelompok dosis 3.

4.7.7 Pengambilan Spesimen

Setelah diberi perlakuan selama 9 minggu, dilakukan pembedahan pada mencit. Pertama, dilakukan anestesi dengan ketamin (10 mg/ml) sebanyak 0,45 ml dan midazolam (0,1 mg/ml) sebanyak 0,3 ml. Setelah dilakukan punksi jantung, dilakukan pembedahan lebih lanjut untuk diambil paru-parunya. Paru-paru tersebut dimasukkan ke dalam mortar, ditambahkan PBS dengan FBS 10%

sebanyak 1 ml, dihancurkan dengan pangkal spuit 1 ml lalu disaring dengan *cell strainer* 100 μm . Hasil saringan kemudian disentrifugasi 3500 rpm selama 2 menit dengan suhu 4°C. Setelah itu, supernatant yang terbentuk dibuang dan pellet ditambah PBS dengan FBS 10% sebanyak 1,5 ml lalu dibagi dalam 6 *microtube*.

4.7.8 Pemeriksaan dengan Metode *Flow Cytometry*

Satu buah *microtube* dikirim ke laboratorium patologi klinik untuk pemeriksaan jumlah limfosit dan 5 *microtube* sisanya disentrifugasi 3500 rpm selama 2 menit pada suhu 4°C. Supernatant yang terbentuk dibuang dan diambil pellet untuk kemudian diinkubasi dengan antibodi selama 20 menit dalam ruangan tertutup (4°C) lalu diberi marker ekspresi CD4 permukaan sel menggunakan FITC, PerCP untuk CD25 dan marker ekspresi FOXP3 sitoplasma menggunakan PE. Kemudian dimasukkan dalam mesin *flow cytometer* lalu dilakukan pembacaan data menggunakan software CellQuest.

4.8 Pengolahan dan Analisis Data

Pada penelitian ini, terdapat lebih dari 2 kelompok perlakuan (data) dan tidak berpasangan, sehingga hasil pengukuran jumlah sel limfosit T-regulator CD4⁺CD25⁺FOXP3 mencit galur *BALB/c* kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dianalisis secara statistik bivariat menggunakan *one-way ANOVA* (*Analysis of Variance*) dengan langkah-langkah sebagai berikut:

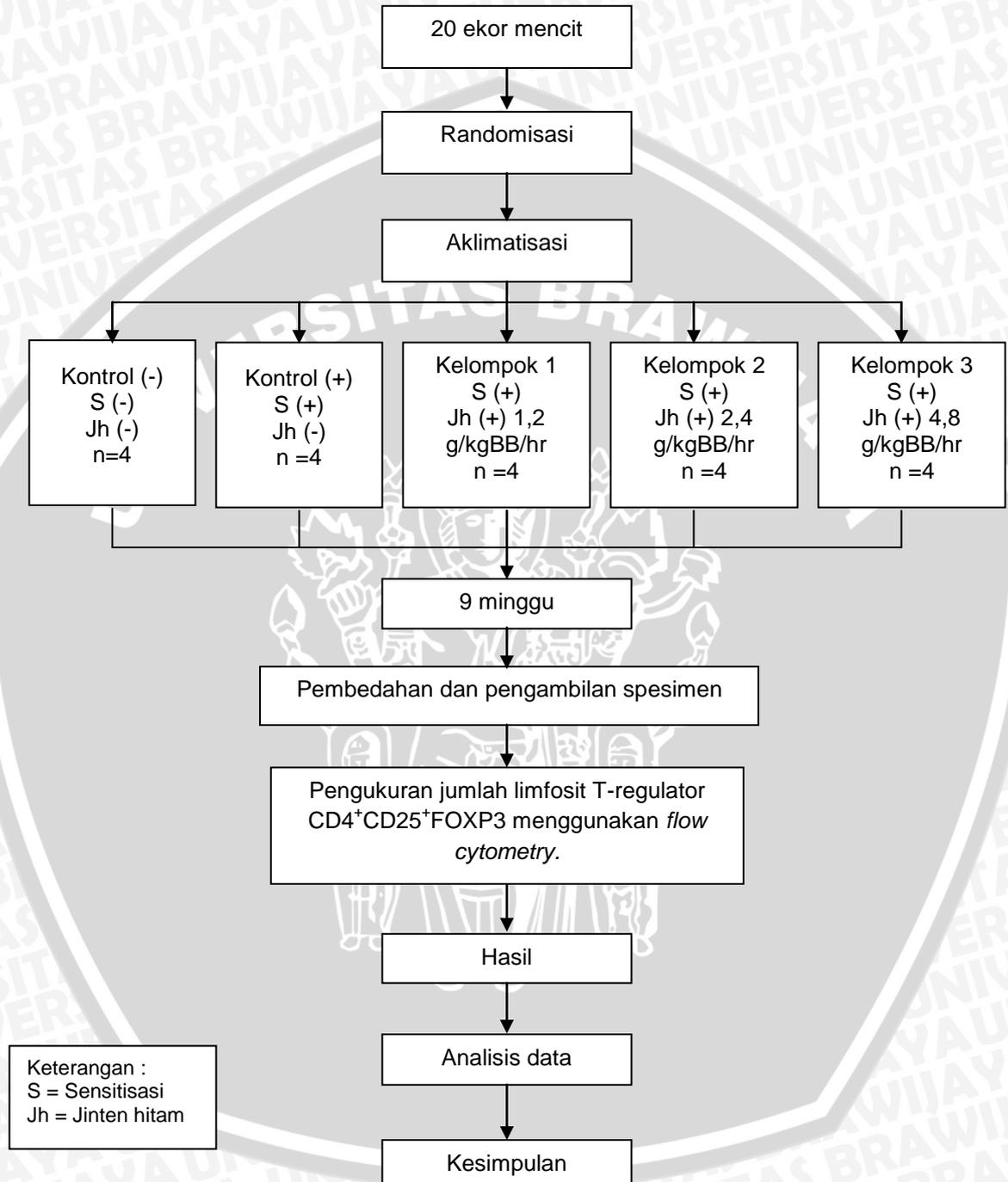
1. Uji parametrik:
 - Uji normalitas: bertujuan untuk menguji berlaku atau tidaknya asumsi ANOVA yaitu apakah data yang diperoleh setiap kelompok

memiliki sebaran data yang normal. Jika sebaran data normal, analisis dilanjutkan dengan uji ANOVA. Jika sebaran data tidak normal, digunakan uji nonparametrik (Kruskal-Wallis).

- Uji homogenitas varian: bertujuan untuk menguji berlaku atau tidaknya asumsi ANOVA, yaitu apakah data yang diperoleh dari setiap kelompok memiliki varian homogen. Jika varian homogen, analisis dilanjutkan dengan ANOVA. Jika varian tidak homogen, digunakan uji nonparametrik (Kruskal-Wallis).
2. Uji *one-way ANOVA*: bertujuan untuk membandingkan nilai rata-rata masing-masing kelompok, serta mengetahui bahwa minimal terdapat dua kelompok yang berbeda secara signifikan.
 3. Analisis *post hoc (Least Significant Difference)*: bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil uji ANOVA. Analisis *post hoc* untuk nonparametrik (Kruskal-Wallis): uji Mann-Whitney.
 4. Uji korelasi Pearson: bertujuan untuk menguji apakah terdapat korelasi yang signifikan antara pemberian jinten hitam terhadap peningkatan jumlah sel limfosit T-regulator CD4⁺CD25⁺FOXP3 pada mencit galur *BALB/c*. Uji korelasi nonparametrik: uji Spearman.

Teknik pengolahan dan analisis data dilakukan dengan menggunakan program *Statistical Product and Service Solution 16 (SPSS)*, dengan tingkat signifikansi atau nilai probabilitas 0,05 ($p=0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$).

4.9 Alur Kerangka Kerja Penelitian



Gambar 4.2 Alur kerja penelitian

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

Penelitian ini terbagi menjadi 5 kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif, kontrol positif, dan tiga kelompok perlakuan (JH1, JH2, JH3) dengan masing-masing kelompok terdiri atas 4 hewan coba berupa mencit galur *BALB/c*. Pada kelompok kontrol positif, JH1, JH2 dan JH3, diberi perlakuan berupa 2 kali sensitisasi ovalbumin secara intraperitoneal, yaitu di hari ke-0 dan ke-14. Kemudian sensitisasi ovalbumin secara inhalasi dengan menggunakan nebulizer selama 20 menit dilakukan setiap 3 kali seminggu dalam waktu 6 minggu. Penyondean ekstrak jinten hitam (*Nigella sativa* L.) diberikan kepada kelompok perlakuan JH1, JH2 dan JH3 selama sensitisasi, dengan dosis ekstrak sebanyak 0,024 ml/ekor pada kelompok JH1, 0,048 ml/ekor pada kelompok JH2 dan 0,096 ml/ekor pada kelompok JH3 selama 9 minggu. Setelah pelakuan mencapai minggu ke-9, dilakukan pembedahan dan pengambilan spesimen untuk diukur kadar limfosit CD4⁺CD25⁺FOXP3.

Data kuantitatif limfosit CD4⁺CD25⁺FOXP3 didapatkan dengan pengukuran menggunakan *flow cytometry*. Hasil pengukuran yang diperoleh berupa jumlah sel limfosit CD4⁺CD25⁺FOXP3, seperti yang dipaparkan pada tabel berikut ini:

Tabel 5.1 Hasil pengukuran jumlah sel limfosit CD4⁺CD25⁺FOXP3

Kelompok	Hasil Pengukuran (x10 ⁴ sel/mm ³)
Kontrol Negatif	31
	36
	36
	43
Kontrol Positif	51
	51
	54
	55
Jinten Hitam Dosis 1	43
	48
	54
	56,14
Jinten Hitam Dosis 2	63
	67
	67
	71
Jinten Hitam Dosis 3	51
	64
	70
	73

Berdasarkan data di atas terlihat bahwa pada kelompok kontrol negatif yang tidak mendapat perlakuan apapun, jumlah sel limfosit CD4⁺CD25⁺FOXP3 adalah normal. Pada kelompok kontrol positif, yaitu kelompok yang hanya mendapatkan ovalbumin tanpa jinten hitam, nilai dari jumlah sel rata-rata mengalami peningkatan. Pada kelompok jinten hitam dosis 1, nilainya sedikit mengalami penurunan. Nilai jumlah sel pada kelompok jinten hitam dosis 2

kembali menunjukkan peningkatan. Pada kelompok jintem hitam 3, jumlah sel nampak bervariasi namun lebih kepada peningkatan.

Tabel 5.2 Rerata hasil pengukuran jumlah sel limfosit CD4⁺CD25⁺FOXP3

Kelompok	Rata-Rata Jumlah Sel	
	Limfosit CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3	Standar Deviasi
Kontrol Negatif	36,50	4,93
Kontrol Positif	52,75	2,06
Jinten Hitam Dosis 1	50,28	5,95
Jinten Hitam Dosis 2	67,00	3,26
Jinten Hitam Dosis 3	64,50	9,74

*Keterangan :

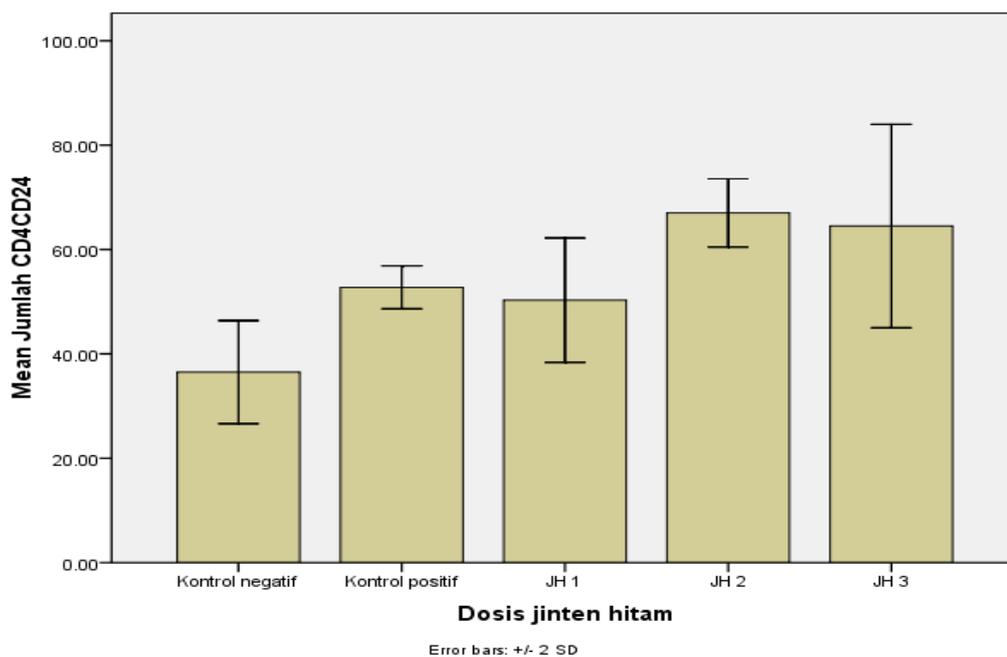
Kontrol negatif : tanpa perlakuan sensitisasi & tanpa pemberian ekstrak jintem hitam

Kontrol positif : dengan perlakuan sensitisasi & tanpa pemberian ekstrak jintem hitam

JH 1 : dengan perlakuan sensitisasi & diberi ekstrak jintem hitam 1,2 g/kgBB/hari (dosis 1)

JH 2 : dengan perlakuan sensitisasi & diberi ekstrak jintem hitam 2,4 g/kgBB/hari (dosis 2)

JH 3 : dengan perlakuan sensitisasi & diberi ekstrak jintem hitam 4,8 g/kgBB/hari (dosis 3)



Gambar 5.1 Grafik perbandingan rata-rata jumlah sel limfosit CD4⁺CD25⁺FOXP3 pada setiap kelompok

Dari tabel dan grafik di atas, terlihat adanya perubahan jumlah sel limfosit CD4⁺CD25⁺FOXP3 dari setiap kelompok. Rata-rata jumlah sel limfosit pada kelompok kontrol negatif, yaitu kelompok tanpa perlakuan sensitisasi ataupun pemberian jinten hitam, didapatkan sebesar $[(36,50 \times 10^4) \pm 4,93]$ sel/mm³, sedangkan pada kelompok kontrol positif, yaitu kelompok dengan perlakuan sensitisasi tanpa pemberian jinten hitam didapatkan sebesar $[(52,75 \times 10^4) \pm 2,06]$ sel/mm³. Pada kelompok JH 1, yaitu kelompok dengan perlakuan sensitisasi dan pemberian ekstrak jinten hitam dosis 1, didapatkan sedikit penurunan nilai rata-rata jumlah sel limfosit menjadi $[(50,28 \times 10^4) \pm 5,95]$ sel/mm³, sedangkan pada kelompok JH 2, yaitu kelompok dengan perlakuan sensitisasi dan pemberian ekstrak jinten hitam dosis 2, diperoleh hasil pengukuran yang lebih besar dari JH 1 yaitu $[(67,00 \times 10^4) \pm 3,26]$ sel/mm³. Pada kelompok JH 3, yaitu kelompok dengan perlakuan sensitisasi dan pemberian ekstrak jinten hitam dosis 3, didapatkan hasil yang sedikit lebih rendah dari JH 2 yaitu sebesar $[(64,50 \times 10^4) \pm 9,74]$ sel/mm³. Dengan demikian, peningkatan jumlah sel limfosit CD4⁺CD25⁺FOXP3 terjadi pada kelompok JH 2 dan JH 3, sedangkan pada JH 1 jumlah sel limfosit mengalami penurunan.

5.2 Analisis Data

Penelitian ini menghasilkan data kuantitatif berupa data numerik dengan lebih dari 2 kelompok perlakuan yang tidak berpasangan, sehingga analisis data dilakukan secara statistik bivariat menggunakan *one-way ANOVA (Analysis of Variance)*. Analisis tersebut dapat dilakukan apabila 3 syarat telah terpenuhi, yaitu skala pengukuran variabel harus berupa variabel numerik, distribusi data

harus normal dan adanya kesamaan varians. Untuk itu, terlebih dahulu dilakukan uji parametrik berupa uji normalitas dan uji homogenitas varians. Seluruh analisis tersebut dikerjakan menggunakan program *Statistical Product and Service Solution 16* (SPSS 16).

Pada uji normalitas atau *test of normality*, nilai *significancy* untuk setiap kelompok adalah $> 0,05$. Karena nilai p pada kelima kelompok $> 0,05$ maka dapat disimpulkan bahwa distribusi data seluruh kelompok perlakuan adalah normal.

Setelah diketahui bahwa distribusi data normal, selanjutnya dilakukan uji homogenitas varians atau *test of homogeneity of variances*. Dari uji tersebut didapatkan nilai p sebesar 0,166. Karena $p > 0,05$ maka disimpulkan bahwa varians seluruh kelompok perlakuan adalah sama, yaitu tidak terdapat perbedaan varians antara kelompok data yang dibandingkan.

Berdasarkan uji parametrik di atas, diketahui bahwa distribusi data adalah normal dan varians data adalah sama, sehingga uji *one-way ANOVA* adalah valid. Pada uji *one-way ANOVA*, didapatkan nilai p sebesar 0,000. Karena nilai $p < 0,05$ maka dapat diambil kesimpulan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna dari minimal 2 perbandingan antara kelompok perlakuan. Untuk mengetahui kelompok mana saja yang berbeda secara bermakna, dilakukan uji lanjutan yaitu analisis *post hoc* (*Least Significant Difference*).

Tabel 5.3 Hasil uji *post hoc* jumlah sel limfosit CD4⁺CD25⁺FOXP3

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Sig.	Keterangan
Kontrol negatif	Kontrol positif	.001	Berbeda signifikan
	JH 1	.004	Berbeda signifikan
	JH 2	.000	Berbeda signifikan

	JH 3	.000	Berbeda signifikan
Kontrol positif	Kontrol negatif	.001	Berbeda signifikan
	JH 1	.559	Tidak berbeda signifikan
	JH 2	.004	Berbeda signifikan
	JH 3	.012	Berbeda signifikan
JH 1	Kontrol negatif	.004	Berbeda signifikan
	Kontrol positif	.559	Tidak berbeda signifikan
	JH 2	.001	Berbeda signifikan
	JH 3	.004	Berbeda signifikan
JH 2	Kontrol negatif	.000	Berbeda signifikan
	Kontrol positif	.004	Berbeda signifikan
	JH 1	.001	Berbeda signifikan
	JH 3	.553	Tidak berbeda signifikan
JH 3	Kontrol negatif	.000	Berbeda signifikan
	Kontrol positif	.012	Berbeda signifikan
	JH 1	.004	Berbeda signifikan
	JH 2	.553	Tidak berbeda signifikan

Berdasarkan analisis *post hoc* tersebut, didapatkan perbedaan jumlah sel limfosit CD4⁺CD25⁺FOXP3 yang signifikan dengan hasil $p < 0,05$ antara kelompok kontrol negatif dengan keempat kelompok lain, yaitu kelompok kontrol positif ($p = 0,001$), JH1 ($p = 0,004$), JH 2 ($p = 0,000$) dan JH 3 ($p = 0,000$). Kemudian didapatkan perbedaan jumlah sel limfosit CD4⁺CD25⁺FOXP3 yang signifikan antara kelompok kontrol positif dengan kelompok JH 2 ($p = 0,004$) dan JH 3 ($p = 0,012$) tetapi tidak pada kelompok JH 1 ($p = 0,559$). Pada perbandingan antara kelompok JH 1 dan JH 2 serta JH 1 dan JH 3 terdapat perbedaan jumlah sel limfosit CD4⁺CD25⁺FOXP3 yang signifikan ($p = 0,001$; $p = 0,004$). Sedangkan tidak ditemukan perbedaan jumlah sel limfosit CD4⁺CD25⁺FOXP3 yang signifikan antara kelompok JH 2 dan JH 3 ($p = 0,553$).

Kemudian untuk mengetahui korelasi antara dosis jinten hitam dengan jumlah sel limfosit CD4⁺CD25⁺FOXP3 dilakukan uji korelasi Pearson (hipotesis korelatif numerik distribusi normal).

Tabel 5.4 Hasil analisis uji korelasi Pearson

Correlations			
		Dosis jinten hitam	Jumlah_CD4CD25
Dosis jinten hitam	Pearson Correlation	1	.823**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	20	20
Jumlah_CD4CD25	Pearson Correlation	.823**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	20	20

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Dari uji korelasi Pearson diperoleh nilai *significancy* sebesar 0,000 yang menunjukkan bahwa korelasi antara dosis jinten hitam dan jumlah sel limfosit CD4⁺CD25⁺FOXP3 adalah bermakna ($p < 0,05$). Diperoleh pula nilai korelasi Pearson (r) sebesar 0,823 yang menunjukkan korelasi positif dengan kekuatan korelasi yang sangat kuat. Arah korelasi yang positif menunjukkan bahwa semakin besar dosis ekstrak jinten hitam yang diberikan maka jumlah sel limfosit CD4⁺CD25⁺FOXP3 semakin meningkat.

BAB 6

PEMBAHASAN

Identifikasi jumlah sel limfosit CD4⁺CD25⁺FOXP3 pada penelitian ini dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya efek pemberian ekstrak jinten hitam (*Nigella sativa* L.) terhadap jumlah sel limfosit CD4⁺CD25⁺FOXP3. Penelitian ini dilakukan pada hewan coba mencit galur BALB/c yang dibagi menjadi 5 kelompok; kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok JH 1, kelompok JH 2 dan kelompok JH 3. Kelompok kontrol negatif merupakan kelompok yang tidak menerima perlakuan apapun, sedangkan kelompok kontrol positif, JH 1, JH 2 dan JH 3 adalah kelompok yang menerima perlakuan sensitisasi alergen menggunakan ovalbumin dan adjuvan aluminium hidroksida yang dipaparkan selama 9 minggu secara kronis. Sensitisasi awal dilakukan dengan injeksi intraperitoneal pada hari ke-0 dan ke-14. Selanjutnya diberi sensitisasi ulangan per inhalasi menggunakan nebulizer. Selama 9 minggu tersebut, kelompok JH 1, JH 2 dan JH 3 masing-masing diberi ekstrak jinten hitam per oral dengan dosis 1,2 g/kgBB/hari, 2,4 g/kgBB/hari dan 4,8 g/kgBB/hari. Kemudian dilakukan pembedahan untuk diambil diperiksa jumlah sel limfosit CD4⁺CD25⁺FOXP3 menggunakan *flow cytometry*.

Hasil yang diperoleh dari kelompok kontrol positif, yaitu kelompok dengan perlakuan sensitisasi tanpa pemberian ekstrak jinten hitam, didapatkan kenaikan jumlah sel limfosit CD4⁺CD25⁺FOXP3 dan berdasarkan uji *post hoc* kenaikan ini bermakna pada berbandingan dengan kelompok kontrol negatif yang tidak disensitisasi alergen ovalbumin. Pemberian ovalbumin sebagai alergen akan

menginduksi sel-sel APC untuk menangkap antigen tersebut untuk kemudian disajikan kepada sel limfosit Th2, lalu Th2 akan menstimulasi sel B dengan sitokin IL-4 untuk memproduksi IgE, yang kemudian menempel pada sel mast. Paparan ulang antigen pada IgE di permukaan sel mast akan mengalami reaksi silang dan menimbulkan degranulasi sel mast, yaitu pelepasan mediator-mediator inflamasi seperti histamin, leukotrien, heparin dan kemokin lainnya yang nantinya akan menyebabkan perubahan morfologi dinding bronkus (*airway remodelling*).

Sel limfosit T-regulator adalah sekelompok sel T yang meregulasi ataupun memiliki efek supresi terhadap sel imun lain. Limfosit T-regulator tidak hanya mengekspresikan molekul sel permukaan CD4 dan CD25 tetapi juga mengekspresikan protein intranuklear FOXP3 sebagai marker spesifik untuk T-regulator. Terdapat dua subset utama T-regulator yang ditemukan saat ini yaitu T-regulator CD4⁺CD25⁺ yang berasal dari timus; T-regulator natural (nTregs). Subset berikutnya adalah T-regulator adaptif (aTregs) yang berasal pula dari timus dan tidak mengekspresikan FOXP3 (Akbari *et al.*, 2005). FOXP3 memprogram perkembangan serta fungsi dari sel limfosit T-regulator CD4⁺CD25⁺ dan berperan sebagai *silencer* pada gen penghasil sitokin (Taylor *et al.*, 2005). T-regulator CD4⁺CD25⁺ secara kuat dapat menghambat pembentukan jalan napas eosinofilik yang diinduksi Th2 (Jaffar *et al.*, 2004). Sel limfosit T-regulator CD4⁺CD25⁺ menghambat produksi IL-4, IL-5 dan IL-13 oleh Th2 dengan mensekresikan IL-10 dan TGF- β , sehingga pada akhirnya menurunkan produksi IgE (Taylor *et al.*, 2001). Pada penelitian ini, kadar jumlah sel limfosit CD4⁺CD25⁺FOXP3 pada kelompok kontrol positif mengalami peningkatan yang signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif ($p = 0,001$). Hal ini

berkontradiksi dengan temuan Mohammed *et al* pada tahun 2011 dan Yang *et al* pada tahun 2013 yang telah melakukan studi tentang kadar sel limfosit CD4⁺CD25⁺FOXP3 pada darah pasien asma. Penelitian mereka menunjukkan penurunan presentase sel limfosit tersebut secara signifikan pada kelompok pasien asma dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hasil studi Gao *et al.* pada tahun 2004 menyatakan bahwa sel limfosit CD4⁺CD25⁺FOXP3 lebih rendah secara signifikan pada limpa mencit model asma dibandingkan mencit normal dan jumlah serta fungsi inhibisinya lemah atau hiporeaktif. Penurunan sel limfosit CD4⁺CD25⁺FOXP3 pada ketiga studi tersebut menghasilkan suatu konsep bahwa menurunnya sel limfosit T-regulator atau hiporeaktifitas merupakan salah satu patogenesis penyebab asma bronkial. Sedangkan hasil eksperimen yang dilakukan Shi *et al.* tahun 2004 menunjukkan bahwa jumlah sel limfosit CD4⁺CD25⁺FOXP3 pada darah meningkat secara signifikan pada fase serangan asma akut pada kelompok asma tetapi tidak meningkat pada kelompok fase asma stabil ataupun kelompok normal. Pada penelitian ini, terdapat peningkatan jumlah sel limfosit CD4⁺CD25⁺FOXP3 pada kelompok kontrol positif yaitu hanya disensitisasi tanpa pemberian jinten hitam. Mekanisme yang mungkin terjadi dari fenomena ini adalah homeostasis tubuh pada mencit kelompok kontrol positif telah terkativasi dengan baik untuk meningkatkan jumlah sel limfosit CD4⁺CD25⁺FOXP3 sebagai bentuk respons fisiologis dalam menekan inflamasi lebih lanjut yang disebabkan Th2.

Kemudian, jumlah sel limfosit CD4⁺CD25⁺FOXP3 pada kelompok JH 1, JH 2 dan JH 3 berbeda secara signifikan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif ($p = 0,004$; $p = 0,000$; $p = 0,000$). Bila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif, terdapat penurunan jumlah sel limfosit CD4⁺CD25⁺FOXP3 pada

kelompok JH 1 dan penurunan ini tidaklah signifikan ($p = 0,559$). Terjadi peningkatan yang signifikan pada kelompok JH 2 dan JH 3 terhadap kelompok kontrol positif ($p = 0,004$; $p = 0,012$).

Berdasarkan hasil analisis statistik korelasi Pearson, pemberian ekstrak jinten hitam memberikan korelasi yang sangat kuat terhadap peningkatan jumlah sel limfosit $CD4^+CD25^+FOXP3$ pada mencit yang disensitisasi dan semakin besar dosis ekstrak jinten hitam yang diterima mencit maka akan semakin besar pula peningkatan jumlah sel limfosit $CD4^+CD25^+FOXP3$.

Jinten hitam (*Nigella sativa* L.) yang diketahui mengandung komponen-komponen seperti *thymoquinone*, *nigellone* dan sebagainya, terbukti memiliki efek imunomodulator (Ali dan Blunden, 2003). Studi yang dilakukan Mohammed *et al.* tahun 2011 menunjukkan bahwa pada kelompok pasien asma dengan terapi kortikosteroid menunjukkan peningkatan kadar jumlah sel limfosit $CD4^+CD25^+FOXP3$ secara signifikan dibandingkan tanpa terapi. Selain itu, pada sebuah penelitian mengenai efek pemberian deksametason dan jinten hitam terhadap jumlah sel eosinofil, IgG dan profil sitokin pada darah perifer dan inflamasi paru model tikus asma yang dilakukan oleh Abbas *et al.* pada tahun 2005 menunjukkan jinten hitam (*Nigella sativa* L.) dapat menginduksi penurunan seluruh variabel tersebut. Dari penelitian ini, didapatkan peningkatan sel limfosit T-regulator $CD4^+CD25^+FOXP3$ yang signifikan pada kelompok JH2 dan JH3 dibandingkan kelompok kontrol positif. Hal ini mendukung hipotesis bahwa jinten hitam dapat menstimulasi sel limfosit T-regulator $CD4^+CD25^+FOXP3$. Stimulasi sel limfosit T-regulator $CD4^+CD25^+FOXP3$ akan mengakibatkan tersupresinya Th2 yang nantinya akan menekan sel B, sekresi IgE, pelepasan sitokin, degranulasi sel mast dan pelepasan mediator inflamasi lainnya, dan pada

akhirnya akan menghambat inflamasi dinding saluran napas serta *airway remodelling*. Sehingga dapat diambil kesimpulan bahwa ekstrak jinten hitam (*Nigella sativa* L.) terbukti meningkatkan jumlah sel limfosit CD4⁺CD25⁺FOXP3 tersebut.

Mencit pada kelompok JH 1 menerima ekstrak jinten hitam dengan dosis sebesar 1,2 g/kgBB/hari (dosis 1) sedangkan pada kelompok JH 2 dan JH 3 dosis ekstrak jinten hitam yang diberikan berturut-turut sebesar 2,4 g/kgBB/hari (dosis 2) dan 4,8 g/kgBB/hari (dosis 3). Jumlah sel limfosit CD4⁺CD25⁺FOXP3 pada mencit yang menerima dosis 1 lebih kecil bila dibandingkan dengan kelompok mencit yang menerima dosis 2 dan dosis 3. Apabila kelompok JH 2 dan JH 3 diperbandingkan, maka terlihat pada kelompok JH 3 yang menerima dosis 3 terjadi sedikit penurunan jumlah sel limfosit CD4⁺CD25⁺FOXP3 namun tidak bermakna bila dibandingkan dengan JH 2 ($p = 0,553$).

Dari penurunan jumlah sel limfosit CD4⁺CD25⁺FOXP3 pada mencit kelompok JH 1 terhadap mencit kelompok kontrol positif dan mencit kelompok JH 3 terhadap mencit kelompok JH 2, terlihat bahwa jumlah sel limfosit CD4⁺CD25⁺FOXP3 tertinggi terdapat pada kelompok JH 2. Dalam hal ini bisa disimpulkan bahwa dosis optimal ekstrak jinten hitam yang dapat meningkatkan jumlah sel limfosit CD4⁺CD25⁺FOXP3 pada penelitian ini adalah 2,4 g/kgBB/hari (dosis 2).

Tidak dilakukannya pemeriksaan laboratorium pada status imun hewan coba sebelum perlakuan adalah keterbatasan utama dari penelitian ini, sehingga tidak diketahui dengan pasti apakah hewan coba tersebut apakah memang memiliki suseptibilitas yang sama ataupun bervariasi terhadap alergi.

Belum diketahui mekanisme pasti yang mendasari meningkatnya jumlah sel limfosit T-regulator CD4⁺ CD25⁺FOXP3 akibat pemberian ekstrak jinten hitam. Selain itu, efek dari jinten hitam selain pada peningkatan sel limfosit T-regulator CD4⁺ CD25⁺FOXP3 perlu diteliti lebih lanjut, dan dosis yang didapatkan perlu diuji kembali efektifitasnya. Namun demikian, dari penelitian ini nampak bahwa jinten hitam berpotensi sebagai modalitas terapi untuk asma bronkial dalam kaitannya dengan peningkatan sel limfosit T-regulator CD4⁺ CD25⁺FOXP3 yang berperan dalam patogenesis baik asma akut maupun kronik. Didukung oleh banyak studi sebelumnya, menjadikan jinten hitam sebagai kandidat terapi herbal pada asma baik untuk jangka pendek maupun jangka panjang.



BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian mengenai efek ekstrak jinten hitam (*Nigella sativa* L.) terhadap jumlah sel limfosit T-regulator CD4⁺CD25⁺FOXP3 pada paru model mencit asma adalah:

1. Pemberian ekstrak jinten hitam (*Nigella sativa* L.) dapat meningkatkan jumlah sel limfosit T-regulator CD4⁺CD25⁺FOXP3 pada paru model mencit asma.
2. Pemberian ekstrak jinten hitam (*Nigella sativa* L.) memiliki korelasi yang sangat kuat terhadap peningkatan jumlah sel limfosit T-regulator CD4⁺CD25⁺FOXP3 dan semakin besar dosis ekstrak jinten hitam maka semakin besar pula peningkatan jumlah sel limfosit T-regulator CD4⁺CD25⁺FOXP3 pada paru model mencit asma.
3. Dosis optimal pemberian ekstrak jinten hitam (*Nigella sativa* L.) dalam meningkatkan jumlah sel limfosit T-regulator CD4⁺CD25⁺FOXP3 pada paru model mencit asma adalah 2,4 g/kgBB/hari.

7.2 Saran

Beberapa hal yang disarankan berdasarkan penelitian ini adalah:

1. Perlunya pemeriksaan status imun hewan coba sebelum perlakuan untuk mengetahui suseptibilitas hewan coba tersebut terhadap alergi sehingga bisa diperkirakan pengaruhnya terhadap hasil perlakuan.

2. Mekanisme molekuler dan imunologi yang mendasari sel limfosit T-regulator $CD4^+CD25^+FOXP3$ perlu dieksplorasi lebih lanjut dan amat diperlukan untuk pengembangan penelitian sel limfosit T-regulator $CD4^+CD25^+FOXP3$ sebagai target terapi asma masa depan.
3. Penelitian lebih lanjut mengenai efek farmakologis jinten hitam (*Nigella sativa* L.) dan mekanisme imunomodulasinya penting dilakukan sehingga dapat membantu pengembangan modalitas terapi pada asma bronkial.
4. Keterlibatan sel limfosit T-regulator $CD4^+CD25^+FOXP3$ dalam patogenesis asma bronkial menjadikannya penting untuk dievaluasi pada penderita asma bronkial dan dapat digunakan untuk diagnosis asma.



DAFTAR PUSTAKA

- Akbari O, Stock P, DeKruyff RH, et al. 2003. Role Of Regulatory T Cells In Allergy And Asthma. *Current Opinion in Immunology*, 15: 627-33.
- Ali BH, Blunden G. 2005. Pharmacological and Toxicological Properties of *Nigella sativa*. *Phytotherapy Research*, 17: 299-305.
- Abbas AT, Abdeel-Aziz MM, Zalata KR, Al-Galel TEA. 2005. Effect of Dexamethasone and *Nigella sativa* on Peripheral Blood Eosinophil Count, IgG₁ and IgG_{2a}, Cytokine Profiles and Lung Inflammation in Murine Model of Allergic Asthma. *The Egyptian Journal of Immunology*, 12 (1): 95-102.
- Baratawidjaja KG, Rengganis I. 2009. *Imunologi Dasar*, Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia, hal. 374-380.
- Barlianto W, Kusuma MSC, Karyono S, Mintaroem K. 2009. Pengembangan Model Mencit Alergi dengan Paparan Kronik Ovalbumin. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 25: 1-5.
- Barnes, PJ, 2008. Immunology of Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Nature Reviews Immunology*, 8: 183-192.
- Dahlan, SM. 2008. *Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan*. Salemba Media, Jakarta, Indonesia.
- Depkes RI. 2009. *Pedoman Pengendalian Penyakit Asma*, Jakarta, Indonesia, hal. 5-6.
- Epstein, MM. 2004. Do Mouse Models of Allergic Asthma Mimic Clinical Disease?. *International Archives of Allergy and Immunology*, 133: 84-100
- Eroschenko, VP. 2000. Di Fiore's Atlas of Histology With Functional Correlation, 9/E, 2001. *Atlas Histologi Di Fiore dengan Korelasi Fungsional*, Tambayong Jan (penterjemah), 2001, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta, Indonesia, hal. 233-243.
- Gao ZY, et al. 2004. Experimental Study of Relationship Between CD4⁺/CD25⁺ Regulatory T Cells and Asthma. *Journal of Chinese Microcirculation* 8:249-50.
- Gazzar ME, Mezayen RE, Merecki JC, Nicolls MR, Canastar A, Dreskin SC. 2006. Anti-inflammatory Effect of Thymoquinone in a Mouse Model of Allergic Lung Inflammation. *International Immunopharmacology*, 6: 1135-1142.
- GINA. 2011. *Global Strategy for Asthma Management and Prevention*, Global Initiative for Asthma Report 2011.

- Hamelmann E, Gelfand EW. 1999. Animal Models of Airway Sensitization. *Current Protocol in Immunology*. 15.18.1-15.18.13
- Henriette. 2000. Henriette's Herbal Homepage. <http://www.henriettesherbal.com/pictures/p09/pages/nigella-sativa-3.htm>.
- Jaffar Z, Sivakuru T, Roberts K. 2004. CD4+CD25+ T cells regulate airway eosinophilic inflammation by modulating the Th2 cell phenotype. *The Journal of Immunology*, 172:3842-9.
- Koehler, *Koehler's Medicinal-Plants*, (Online), (<http://pharm1.pharmazie.uni-greifswald.de/allgemei/koehler/koeh-eng.htm>, diakses 5 Januari 2011).
- Kresno, SB. 2010. *Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*, Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia, hal. 161-170, 396-419.
- Mohammed EK, Asheiba ZF, Ali MHE. 2011. Role of Circulating CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ Regulatory T-Cells in Paediatric Asthma. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, 42: 73-84.
- Price SA, Wilson LM. 2002. Pathophysiology: Clinical Concepts of Disease Processes, 6/E, 2003. *Patofisiologi: Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit, E/6, Vol.1*, Pendit UB (penterjemah), 2006, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta, Indonesia, hal. 177-188.
- Rakhmatiar, F. 2009. *Efek Ekstrak Jinten Hitam (Nigella sativa L.) terhadap Ketebalan Epitel Bronkiolus pada Model Mencit Alergi*. Tugas Akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang, Jawa Timur.
- Rengganis, Iris. 2008. Diagnosis dan Tatalaksana Asma Bronkial. *Majalah Kedokteran Indonesia*, 58 (11): 444-481.
- Robbins SL, Cotran RS, Kumar V, 2003. Robbins Basic Pathology 7th ed, 2004. *Buku Ajar Patologi, Edisi 7, Volume 2*, Pendit BU (penterjemah), 2007, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta, Indonesia, hal. 511-514.
- Salem, ML. 2005. Immunomodulatory and Therapeutic Properties of the Nigella sativa L. Seed. *International Immunopharmacology*, 5: 1749-1770.
- Sastroasmoro S, Ismael S. 2008. *Dasar-Dasar Metodologi Penelitian Klinis*, Sagung Seto, Jakarta, Indonesia.
- Shahzad M, et al. 2009. Black Seed Oil Ameliorates Allergic Airway Inflammation by Inhibiting T-Cell Proliferation in Rats. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 22; 37-43.

- Shi HZ, *et al.* 2004. Regulatory CD4+CD25+ T lymphocytes in peripheral blood from patients with atopic asthma. *Clinical Immunology*, 113:172-8.
- Solimun. 2001. *Diktat Metodologi Penelitian LKIP dan PKM Kelompok Agrokompleks*, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang, Jawa Timur.
- Sundaru H, *Asma: Bisa Sembuh atau Problem Seumur Hidup?*, (Online), (<http://medicastore.com/asma/>, diakses 2 Januari 2011).
- Sundaru H, Sukamto. 2009. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam, Edisi 5, Jilid 1*, Interna Publishing, Jakarta, Indonesia, hal. 404-414.
- Sundaru, H. 2005. Epidemiology of Asthma in Indonesia. *The Indonesian Journal of Internal Medicine*, 37(1): 51-54.
- Taylor PA, Noelle RJ, Blazar BR. 2001. CD4+CD25+ immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade. *The Journal of Experimental Medicine* 193: 1311-8.
- Taylor A, *et al.* 2005. T regulatory cells and allergy. *Microbes and Infection*, 7: 1049-55.
- Tiemessen MM, Jagger AL, Evans HG, van Herwijnen MJC, John S, Taams LS. 2007. CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Regulatory T Cells Induce Alternative Activation of Human Monocytes/Macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(49):19446-19451.
- Yamasaki M, Takahashi N, Hirose M. 2003. Crystal Structure of S-ovalbumin as a Non-loop-inserted Thermostabilized Serpin Form. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(37): 35524-35530.
- Yagi H, *et al.* 2004. Crucial Role of FOXP3 in the Development and Function of Human CD25⁺CD4⁺ Regulatory T Cells. *International Immunology*, 16(11): 1643-1656.
- Yang YL, Pan YQ, He BS, Zhong TY. 2013. Regulatory T cells and Th1/Th2 in Peripheral Blood and Their Roles in Asthmatic Children. *Translational Pediatrics*, 2(1): 27-33.
- Young B, Lowe JS, Stevens A, Heath JW. 2007. *Weather's Functional Histology: A Text and Colour Atlas*, Fifth Edition, Elsevier, United States of America.
- Yulianti S, Junaedi E. 2006. *Sembuhkan Penyakit dengan Habbatussauda*, AgroMedia Pustaka, Depok, Indonesia.
- Zhang L, Zhao Y. 2007. The Regulation of Foxp3 Expression in Regulatory CD4⁺CD25⁺T Cells: Multiple Pathway on The Road. *Journal of Cellular Physiology*, 211: 590-597.

LAMPIRAN

Lampiran 1 Keterangan Kelaikan Etik

	<p>KEMENTERIAN PENDIDIKAN NASIONAL MINISTRY OF NATIONAL EDUCATION FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA MEDICAL FACULTY BRAWIJAYA UNIVERSITY KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN THE ETHICAL COMMITTEE OF MEDICAL RESEARCH Jalan Veteran Malang – 65145 Telp. (0341) 551611 Pes. 213.214; 569117, 567192 – Fax. (62) (0341) 564755 e-mail : kepk.fkub@gmail.com http://fk.brawijaya.ac.id</p>
<p>KETERANGAN KELAIKAN ETIK ("ETHICAL CLEARANCE")</p>	
<p>No. 0418 / EC / KEPK– S3 - JK / 12 / 2010</p>	
<p>KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA, SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN</p>	
<p>JUDUL : PENCEGAHAN SERANGAN ASMA MELALUI MODULASI SISTIM IMUN DAN HAMBATAN AIRWAY REMODELLING SETELAH PEMBERIAN EKSTRAK KASAR JINTEN HITAM (NIGELLA SATIVA) PADA MODEL MENCIT ASMA</p>	
<p>PENELITI UTAMA : dr. WISNU BARLIANTO, SpA, Msi. Med</p>	
<p>UNIT /LEMBAGA/TEMPAT PENELITIAN : LABORATORIUM FARMAKOLOGI FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG</p>	
<p>DINYATAKAN LAIK ETIK</p>	<p>Malang, 23 DEC 2010</p>
	<p>Ketua, </p>
	<p>Prof. Dr. dr. Moch. Istiadjid ES, SpS, SpBS, M.Hum</p>





**KEMENTERIAN PENDIDIKAN NASIONAL
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN**

Jalan Veteran Malang – 65145
Telp. (0341) 551611 Pes. 213.214; 569117, 567192 – Fax. (62) (0341) 564755
e-mail : kepk.fkub@gmail.com <http://fk.brawijaya.ac.id>

FORMULIR ETIK PENELITIAN KESEHATAN

1.	Peneliti Utama (Title Unit Pelayanan) dr. Wisnu Barlianto, SpA, Msi.Med Program Pasca Sarjana Fakultas Kedokteran Unibraw Multisenter Ya <input type="checkbox"/> Tidak <input checked="" type="checkbox"/>
2.	Judul penelitian : PENCEGAHAN SERANGAN ASMA MELALUI MODULASI SISTIM IMUN DAN HAMBATAN AIRWAY REMODELLING SETELAH PEMBERIAN EKSTRAK KASAR JINTEN HITAM (NIGELLA SATIVA) PADA MODEL MENCIT ASMA
3.	Subjek Pasien <input type="checkbox"/> Non Pasien <input type="checkbox"/> Hewan <input checked="" type="checkbox"/>
4.	Perkiraan waktu Penelitian yang dapat diselesaikan untuk tiap partisipan 9 minggu
5.	Ringkasan usulan penelitian yang mencakup objektif / tujuan penelitian/ manfaat / relevansi dari hasil penelitian dan alasan / motivasi untuk melakukan penelitian (ditulis dalam bahasa yang mudah dipahami oleh orang yang bukan dokter) Asma adalah gangguan peradangan kronik pada saluran napas dengan banyak sel yang berperan. Sampai saat ini terapi kortikosteroid inhalasi masih merupakan terapi yang paling efektif dalam pengobatan asma. Namun demikian, kortikosteroid tidak dapat menyembuhkan asma secara total dan penghentian terapi akan menimbulkan kekambuhan gejala asma. Biji dan minyak jinten hitam telah lama digunakan sebagai terapi asma di Arab dan beberapa Negara Timur tengah lainnya. Jinten hitam sebagai obat herbal sudah dibuktikan baik secara in vivo dan in vitro memiliki potensi sebagai imunomodulator dan memiliki efek anti radang. Sejauh ini belum ada penelitian yang mengkaji kemampuan imunomodulator jinten hitam pada peradangan karena alergi melalui keseimbangan proliferasi dan apoptosis limfosit T serta kemampuan jinten hitam menghambat perubahan struktur saluran napas karena asma.



	<p>Berdasarkan hal ini, layak dikaji kemampuan jinten hitam memodulasi peradangan karena alergi melalui keseimbangan proliferasi dan apoptosis limfosit T dan kemampuan jinten hitam menghambat perubahan struktur saluran napas.</p> <p>Tujuan penelitian ini adalah untuk membuktikan pengaruh imunomodulator jinten hitam terhadap sistem kekebalan dan perubahan struktur saluran napas pada model mencit asma</p> <p>Manfaat penelitian ini adalah dapat mengembangkan terapi baru dalam mengatasi peradangan pada asma dalam upaya pencegahan serangan asma.</p>
6.	<p>Masalah etik (Nyatakan pendapat anda tentang masalah etik yang mungkin dihadapi)</p> <p>Masalah etik yang mungkin dihadapi adalah rasa nyeri saat pembedahan. Untuk itu digunakan obat anestesi ketamin dan obat sedative midazolam. Setelah pengambilan organ, mencit dikuburkan.</p>
7.	<p>Bila penelitian ini menggunakan subjek manusia, apakah percobaan pada hewan sudah dilakukan? Bila belum, sebutkan alasan untuk memulai penelitian ini langsung pada manusia</p> <p>Penelitian ini tidak menggunakan subjek manusia</p>
8.	<p>Prosedur eksperimen (Frekuensi, interval, dan jumlah total segala tindakan invasive yang akan dilakukan, dosis dan cara pemberian obat, isotop, radiasi dan tindakan lain)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Injeksi ovalbumin dan Aluminium hidroksida sebanyak 0,5 ml secara intra peritoneal sebanyak 2 kali dengan interval 2 minggu - Inhalasi ovalbumin 1% selama 20 menit selama 6 minggu (3 kali seminggu) - Pemberian jinten hitam per sonde dengan dosis 0,02 ml, 0,04 ml, dan 0,09 ml setiap hari
9.	<p>Bahaya potensial yang langsung atau tidak langsung segera atau kemudian dan cara mencegah atau mengatasi kejadian (termasuk rasa nyeri dan keluhan lain) :</p> <p>Terjadinya respon anafilaksis sistemik akibat paparan ovalbumin. Untuk itu dilakukan observasi tanda-tanda anafilaksis selama dan 30 menit setelah paparan. Bila terjadi gejala anafilaksis diberikan adrenalin 0,1 mg/kg secara intramuskular.</p> <p>Rasa nyeri saat pembedahan. Untuk mengatasinya dilakukan pembiusan dengan ketamin dan midazolam sebelum pembedahan</p>
10	<p>Pengalaman terdahulu (sendiri atau orang lain) dari tindakan yang hendak diterapkan :</p> <p>Sebelumnya telah dilakukan penelitian serupa dengan menggunakan subjek mencit dan tidak ada masalah dari tindakan yang hendak diterapkan</p>

Lampiran 2 Sertifikat Mencit BALB/c

75



UNIVERSITAS GADJAH MADA
LABORATORIUM PENELITIAN DAN PENGUJIAN TERPADU
(LPPT - UGM)
Bidang Layanan Penelitian Pra - Klinik dan Pengembangan Hewan Percobaan
Jl. Agro Karang Malang Kampus UGM
Telp. (0274) 7497705, FAX. (0274) 546868, e-mail: lppt_info@mail.ugm.ac.id

SURAT KETERANGAN
NO : 155/LP3HP/21 - IX/2010

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Dr. drh. Pudji Astuti, M. P.
NIP : 19601012 198703 2 001
Jabatan : Kabid Unit Pra Klinik - LPPT UGM.

Menerangkan bahwa ;

Nama : dr. Wisnu
Pekerjaan : Dosen
Instansi : Fakultas Kedokteran UNIBRAW Malang.

Pada Bulan September 2010 membeli mencit putih (*Mus musculus L.*) betina Galur *Balb/c* usia 1½ bulan sejumlah 50 (Lima puluh) ekor dari Unit Pra-klinik - LPPT Universitas Gadjah Mada.

Hewan tersebut dalam keadaan masih Fertil dan tidak terinfeksi penyakit sehingga tidak menularkan penyakit.
Menurut keterangan dari yang bersangkutan, Hewan tersebut akan dibawa ke Fakultas Kedokteran UNIBRAW Malang Jawa Timur dan akan digunakan sebagai hewan percobaan penelitian.

Demikian surat keterangan ini di buat, semoga dapat dipergunakan sebagaimana mestinya. dan atas kerjasama yang baik di ucapkan terima kasih.

Yogyakarta, 21 September 2010
Kabid Unit Pra-Klinik,

Dr. drh. Pudji Astuti, M. P.
NIP : 19601012 198703 2 001



Lampiran 3 Sertifikat Jinten Hitam (*Nigella Sativa*)

DINAS KESEHATAN PROPINSI JAWA TIMUR

UPT MATERIA MEDICA

Jalan Lahor No.87 Telp. (0341) 593396 Batu (65313)

KOTA BATU

Nomor : 074 / 82 / 101.8 / 2010
 Sifat : Biasa
 Perihal : Determinasi Tanaman Jinten hitam

Nama : Memenuhi permohonan saudara :
 SEVITA NURIL FIRDAUSI (0810710104)
 DUROTUL IKRIMAH (0910710007)
 SISKI DAN TI MANGGARSAR (0910710015)
 ADITYA INDRA MAHENDRA (0910710025)
 SETYA TRISTA KUSUMAWAHYUNI (0810713083)
 Fakultas : Fakultas Kedokteran
 Universitas Brawijaya Malang

1. Perihal determinasi tanaman Jinten Hitam
 Divisi : **Spermatophyta**
 Sub divisi : Angiospermae.
 Kelas : Dicotyledonae
 Bangsa : Ranunculales
 Suku : Ranunculaceae
 Marga : **Nigella**
 Jenis : **Nigella sativa L.**
 Sinonim : -
2. Nama Simplisia : Nigellae sativae Semen/ Biji jinten hitam.
3. Kandungan : Biji dan daun mengandung saponin dan polifenol. Biji mengandung minyak atsiri nigelon, vitamin, mineral, protein, alkaloida, timokuinon, sterol dan betasisterol
4. Penggunaan : Penelitian
5. Daftar Pustaka : - Syamsuhidayat, Sri sugati, Hutapea, Johny Ria. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia* Departemen Kesehatan Republik Indonesia : Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan.
 - <http://www.idionline.co.id>
 - <http://www.ipteknet.co.id>

Demikian determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 7 Oktober 2010
 Kepala UPT Materia Medica Batu

Drs. Husin RM, Apt., MKes.
 NIP.196111021991031003

Lampiran 4 Sertifikat Ovalbumin

77

ANALYSENZERTIFIKAT CERTIFICATE OF ANALYSIS

SERVA
Electrophoresis

Albumin aus Hühnerei lyophil. salzfrei	Kat.Nr./Cat.No. :	11841
Albumin egg (ovalbumin) lyophil. salt-free	Lot/Contr.No. :	100002

Parameter parameter	Methode method	Spezifikation specification	Ergebnis result
Aussehen appearance		weißes bis hellgelbes Lyophilisat white to pale yellow lyophilisate	entspricht corresponds
Gehalt (%) (Ovalbumin) assay	SDS-PAGE	min. 98.0	98.0
Trocknungsverlust (%) moisture		≤ 6 %	2.5
Mindesthaltbarkeit minimum shelf life			01/ 2012
Lagerung (°C) storage			-15 °C to -25 °C

Die Eignung des Produktes für spezielle Anwendungszwecke wird nicht zugesichert.
Dieses Dokument entbindet nicht von einer branchenüblichen Eingangskontrolle.
We do not guarantee that the product can be used for a special application.
This document does not release you from performing the standard control upon receipt of incoming goods.

SERVA Electrophoresis GmbH
Qualitätskontrolle/ Quality Control

Druckdatum/ printing date: 26.02.2010

Dipl.-Ing. (FH) Bernhard Göckel

Daniela Lux-Helmstetter

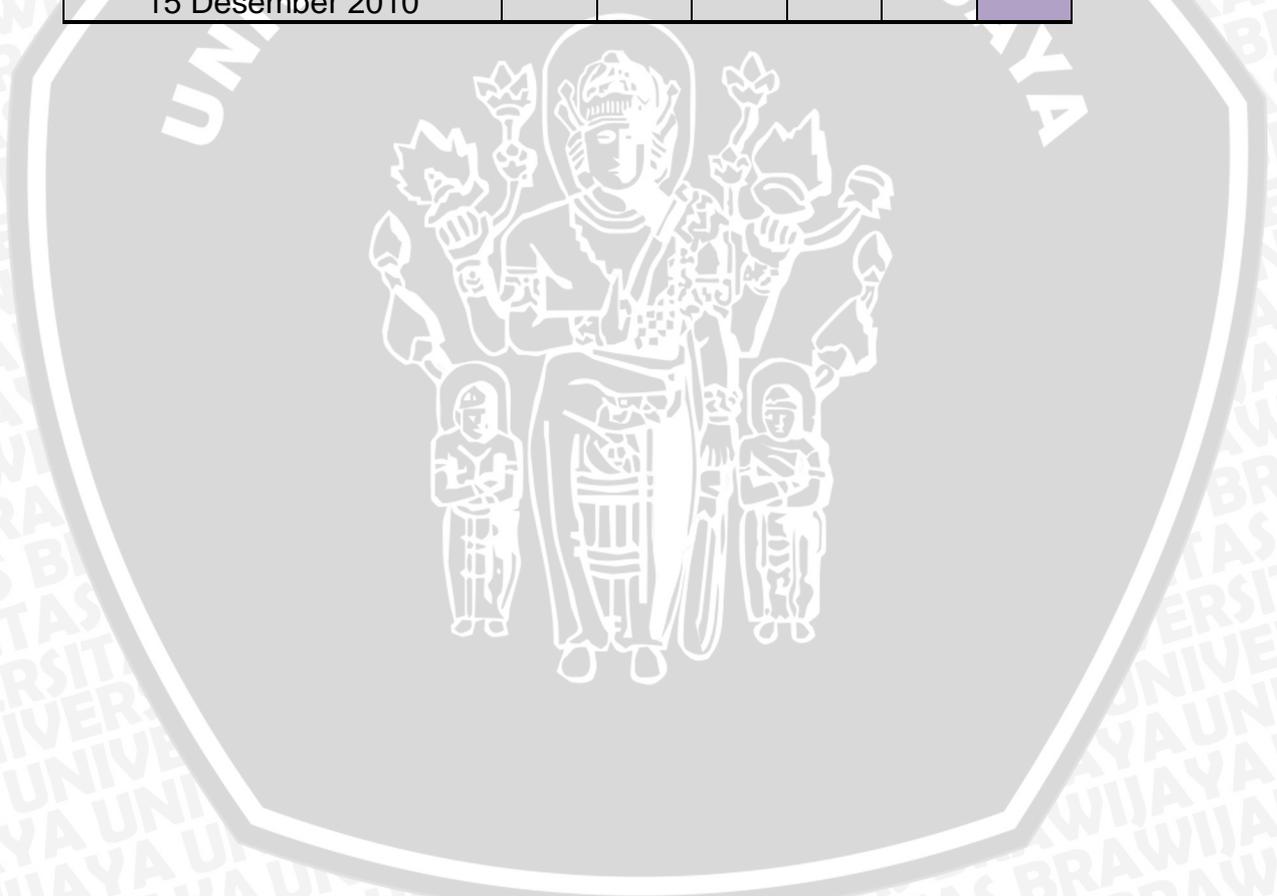
Dieses Dokument ist ein Computerausdruck und deshalb ohne Unterschrift gültig.
This report has been computer generated and does not contain a signature.

SERVA Electrophoresis GmbH • D-69115 Heidelberg • Carl-Benz-Str. 7 • Tel.: +49 6221 138 40-0 • Fax: +49 6221 138 40-10
Geschäftsführer: Dr. Barbara Müller, Dr. Manfred Kurlust • HRB 336136 AG Mannheim • E-Mail: info@serva.de • http://www.serva.de
COMMERZBANK BLZ: 672 400 39 Kto: 190 38 30 00 • IBAN: DE90 6724 0039 0190 3830 00 • BIC: COBADEFFXXX • Ust.ID-Nr.: DE-812 647 285

Lampiran 5 Jadwal Sensitisasi Inhalasi (Nebulizer)

CHECKLIST NEBULIZER						
TANGGAL	KEL 1	KEL 2	KEL 3	KEL 4	KEL 5	KEL 6
	NS	OVALBUMIN				
27 Oktober 2010						
28 Oktober 2010						
29 Oktober 2010						
30 Oktober 2010						
31 Oktober 2010						
01 Nopember 2010						
02 Nopember 2010						
03 Nopember 2010						
04 Nopember 2010						
05 Nopember 2010						
06 Nopember 2010						
07 Nopember 2010						
08 Nopember 2010						
09 Nopember 2010						
10 Nopember 2010						
11 Nopember 2010						
12 Nopember 2010						
13 Nopember 2010						
14 Nopember 2010						
15 Nopember 2010						
16 Nopember 2010						
17 Nopember 2010						
18 Nopember 2010						
19 Nopember 2010						
20 Nopember 2010						
21 Nopember 2010						
22 Nopember 2010						
23 Nopember 2010						
24 Nopember 2010						
25 Nopember 2010						
26 Nopember 2010						
27 Nopember 2010						
28 Nopember 2010						
29 Nopember 2010						
30 Nopember 2010						

01 Desember 2010						
02 Desember 2010						
03 Desember 2010						
04 Desember 2010						
05 Desember 2010						
06 Desember 2010						
07 Desember 2010						
08 Desember 2010						
09 Desember 2010						
10 Desember 2010						
11 Desember 2010						
12 Desember 2010						
13 Desember 2010						
14 Desember 2010						
15 Desember 2010						



Lampiran 6 Jadwal Sonde Jinten Hitam

CHECKLIST SONDE JINTEN HITAM				
TANGGAL	KEL 3	KEL 4	KEL 5	KEL 6
13 Oktober 2010				
14 Oktober 2010				
15 Oktober 2010				
16 Oktober 2010				
17 Oktober 2010				
18 Oktober 2010				
19 Oktober 2010				
20 Oktober 2010				
21 Oktober 2010				
22 Oktober 2010				
23 Oktober 2010				
24 Oktober 2010				
25 Oktober 2010				
26 Oktober 2010				
27 Oktober 2010				
28 Oktober 2010				
29 Oktober 2010				
30 Oktober 2010				
31 Oktober 2010				
01 November 2010				
02 November 2010				
03 November 2010				
04 November 2010				
05 November 2010				
06 November 2010				
07 November 2010				
08 November 2010				
09 November 2010				
10 November 2010				
11 November 2010				
12 November 2010				
13 November 2010				
14 November 2010				
15 November 2010				
16 November 2010				
17 November 2010				
18 November 2010				

**JADWAL MULAI
SONDE JINTEN
HITAM**
**KELOMPOK 3 : 26
OKTOBER 2010**
**KELOMPOK 4 : 27
OKTOBER 2010**
**KELOMPOK 5 : 28
OKTOBER 2010**
**KELOMPOK 6 : Pada
saat IP (13 OKTOBER
2010)**

19 November 2010				
20 November 2010				
21 November 2010				
22 November 2010				
23 November 2010				
24 November 2010				
25 November 2010				
26 November 2010				
27 November 2010				
28 November 2010				
29 November 2010				
30 November 2010				
01 Desember 2010				
02 Desember 2010				
03 Desember 2010				
04 Desember 2010				
05 Desember 2010				
06 Desember 2010				
07 Desember 2010				
08 Desember 2010				
09 Desember 2010				
10 Desember 2010				
11 Desember 2010				
12 Desember 2010				
13 Desember 2010				
14 Desember 2010				
15 Desember 2010				

**JADWAL MULAI
SONDE JINTEN
HITAM**
**KELOMPOK 3 : 26
OKTOBER 2010**
**KELOMPOK 4 : 27
OKTOBER 2010**
**KELOMPOK 5 : 28
OKTOBER 2010**
**KELOMPOK 6 : Pada
saat IP (13 OKTOBER
2010)**



Lampiran 7 Dokumentasi Penelitian



Sensitisasi alergen secara intraperitoneal



Perawatan dan penyondean mencit



Sensitisasi alergen secara inhalasi menggunakan nebulizer



Pembedahan mencit dan pengambilan spesimen pungsi jantung



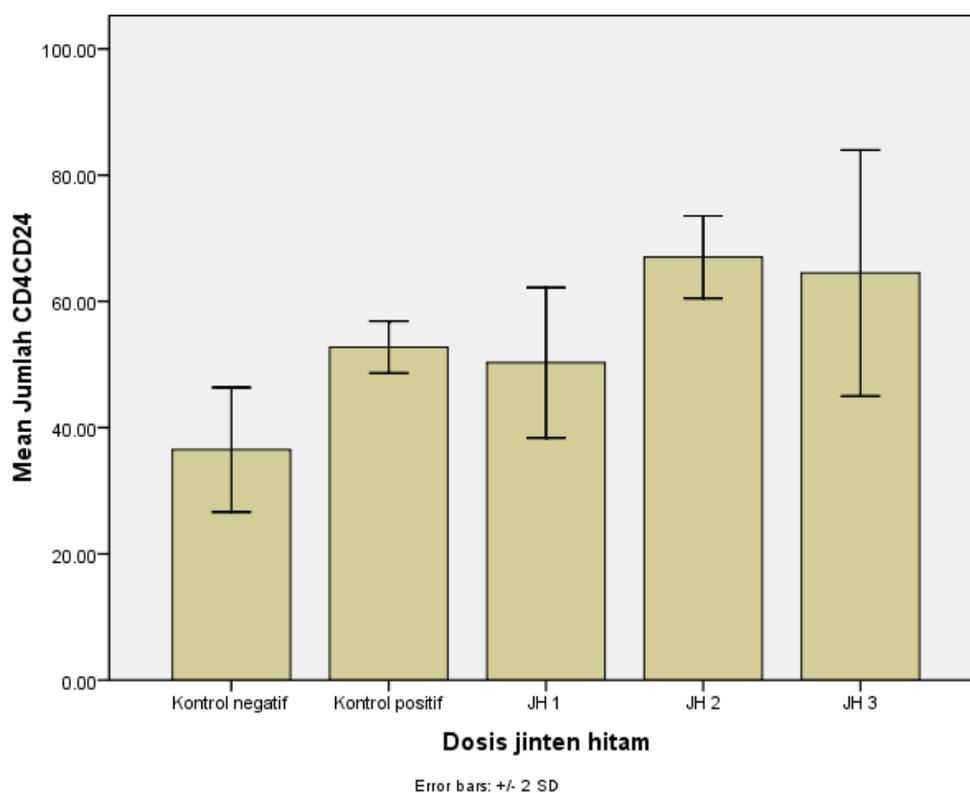
Preparasi pengukuran sampel

Lampiran 8 Hasil Pengukuran Jumlah Sel Limfosit CD4⁺CD25⁺FOXP3

Kelompok	Hasil Pengukuran (x10 ⁴ sel/mm ³)
Kontrol Negatif	31
	36
	36
	43
Kontrol Positif	51
	51
	54
	55
Jinten Hitam Dosis 1	43
	48
	54
	56,14
Jinten Hitam Dosis 2	63
	67
	67
	71
Jinten Hitam Dosis 3	51
	64
	70
	73

Lampiran 9 Rerata Jumlah Sel Limfosit CD4⁺CD25⁺FOXP3

Kelompok	Rata-Rata Jumlah Sel Limfosit CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3	Standar Deviasi
Kontrol Negatif	36,50	4,93
Kontrol Positif	52,75	2,06
Jinten Hitam Dosis 1	50,28	5,95
Jinten Hitam Dosis 2	67,00	3,26
Jinten Hitam Dosis 3	64,50	9,74



Lampiran 10. Hasil Uji Normalitas

Case Processing Summary

Kelompok		Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
Jumlah_CD4CD25	Kontrol negatif	4	100.0%	0	.0%	4	100.0%
	Kontrol positif	4	100.0%	0	.0%	4	100.0%
	JH 1	4	100.0%	0	.0%	4	100.0%
	JH 2	4	100.0%	0	.0%	4	100.0%
	JH 3	4	100.0%	0	.0%	4	100.0%

Tests of Normality

Kelompok		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Jumlah_CD4CD25	Kontrol negatif	.290	4	.	.932	4	.605
	Kontrol positif	.302	4	.	.827	4	.161
	JH 1	.234	4	.	.945	4	.688
	JH 2	.250	4	.	.945	4	.683
	JH 3	.230	4	.	.912	4	.491

a. Lilliefors Significance Correction

Descriptives

Dosis jinten hitam			Statistic	Std. Error
Jumlah CD4CD24	Kontrol negatif	Mean	36.5000	2.46644
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	28.6507
		Upper Bound	44.3493	
		5% Trimmed Mean	36.4444	
		Median	36.0000	



	Variance		24.333	
	Std. Deviation		4.93288	
	Minimum		31.00	
	Maximum		43.00	
	Range		12.00	
	Interquartile Range		9.00	
	Skewness		.600	1.014
	Kurtosis		1.701	2.619
Kontrol positif	Mean		52.7500	1.03078
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	49.4696	
		Upper Bound	56.0304	
	5% Trimmed Mean		52.7222	
	Median		52.5000	
	Variance		4.250	
	Std. Deviation		2.06155	
	Minimum		51.00	
	Maximum		55.00	
	Range		4.00	
	Interquartile Range		3.75	
	Skewness		.200	1.014
	Kurtosis		-4.858	2.619
	JH 1	Mean		50.2850
95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	40.8098	
		Upper Bound	59.7602	
5% Trimmed Mean			50.3644	
Median			51.0000	
Variance			35.458	
Std. Deviation			5.95468	
Minimum			43.00	
Maximum		56.14		

	Range		13.14	
	Interquartile Range		11.36	
	Skewness		-.463	1.014
	Kurtosis		-2.340	2.619
JH 2	Mean		67.0000	1.63299
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	61.8031	
		Upper Bound	72.1969	
	5% Trimmed Mean		67.0000	
	Median		67.0000	
	Variance		10.667	
	Std. Deviation		3.26599	
	Minimum		63.00	
	Maximum		71.00	
	Range		8.00	
	Interquartile Range		6.00	
	Skewness		.000	1.014
	Kurtosis		1.500	2.619
JH 3	Mean		64.5000	4.87340
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	48.9907	
		Upper Bound	80.0093	
	5% Trimmed Mean		64.7778	
	Median		67.0000	
	Variance		95.000	
	Std. Deviation		9.74679	
	Minimum		51.00	
	Maximum		73.00	
	Range		22.00	
	Interquartile Range		18.00	
	Skewness		-1.210	1.014
	Kurtosis		1.034	2.619

Lampiran 11. Hasil uji one-way ANOVA

Descriptives

Jumlah_CD4CD25

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol negatif	4	36.5000	4.93288	2.46644	28.6507	44.3493	31.00	43.00
Kontrol positif	4	52.7500	2.06155	1.03078	49.4696	56.0304	51.00	55.00
JH 1	4	50.2850	5.95468	2.97734	40.8098	59.7602	43.00	56.14
JH 2	4	67.0000	3.26599	1.63299	61.8031	72.1969	63.00	71.00
JH 3	4	64.5000	9.74679	4.87340	48.9907	80.0093	51.00	73.00
Total	20	54.2070	12.37936	2.76811	48.4133	60.0007	31.00	73.00

Test of Homogeneity of Variances

Jumlah_CD4CD25

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.882	4	15	.166

ANOVA

Jumlah_CD4CD25

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2402.598	4	600.649	17.697	.000
Within Groups	509.125	15	33.942		
Total	2911.723	19			

Lampiran 12. Hasil Uji Post Hoc

Multiple Comparisons

Jumlah_CD4CD25

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol negatif	Kontrol positif	-16.25000*	4.11957	.001	-25.0306	-7.4694
	JH 1	-13.78500*	4.11957	.004	-22.5656	-5.0044
	JH 2	-30.50000*	4.11957	.000	-39.2806	-21.7194
	JH 3	-28.00000*	4.11957	.000	-36.7806	-19.2194
Kontrol positif	Kontrol negatif	16.25000*	4.11957	.001	7.4694	25.0306
	JH 1	2.46500	4.11957	.559	-6.3156	11.2456
	JH 2	-14.25000*	4.11957	.004	-23.0306	-5.4694
	JH 3	-11.75000*	4.11957	.012	-20.5306	-2.9694
JH 1	Kontrol negatif	13.78500*	4.11957	.004	5.0044	22.5656
	Kontrol positif	-2.46500	4.11957	.559	-11.2456	6.3156
	JH 2	-16.71500*	4.11957	.001	-25.4956	-7.9344
	JH 3	-14.21500*	4.11957	.004	-22.9956	-5.4344
JH 2	Kontrol negatif	30.50000*	4.11957	.000	21.7194	39.2806
	Kontrol positif	14.25000*	4.11957	.004	5.4694	23.0306
	JH 1	16.71500*	4.11957	.001	7.9344	25.4956
	JH 3	2.50000	4.11957	.553	-6.2806	11.2806
JH 3	Kontrol negatif	28.00000*	4.11957	.000	19.2194	36.7806
	Kontrol positif	11.75000*	4.11957	.012	2.9694	20.5306
	JH 1	14.21500*	4.11957	.004	5.4344	22.9956
	JH 2	-2.50000	4.11957	.553	-11.2806	6.2806

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran 13 Hasil Uji Korelasi Pearson

Correlations

		Dosis jinten hitam	Jumlah_CD4CD25
Dosis jinten hitam	Pearson Correlation	1	.823**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	20	20
Jumlah_CD4CD25	Pearson Correlation	.823**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	20	20

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).



Lampiran 14 Pernyataan Keaslian Tulisan**PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN**

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Siska Danti Manggarsari
NIM : 0910710015
Program Studi : Program Studi Pendidikan Dokter
Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya aku sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, Februari 2013

Yang membuat pernyataan,

(Siska Danti Manggarsari)

NIM. 0910710015